

---

Entwicklung eines Referenzverfahrens zur Quantifizierung von Hämoglobin mittels  
oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie an Immunoassays

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sarah Schmidt  
aus Marburg

---

1. Referentin:

Prof. Dr. Petra Mischnick

2. Referent:

Prof. Dr. Meinhard Schilling

eingereicht am:

07.12.2020

mündliche Prüfung (Disputation) am:

13.04.2021

Druckjahr 2021

---

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Hashemi P, Luckau L, Mischnick P, Schmidt S, Stosch R, Wünsch B. Biomacromolecules as tools and objects in nanometrology—current challenges and perspectives. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409:5901–5909.

### **Tagungsbeiträge**

Schmidt S, Frank C, Wundrack S, Stosch R: SI traceable quantification of hemoglobin using an ID-SERS active immunoassay: Nanomedicine International Conderence and Exhibition, Venedig, Italien (2018), Vortrag.

### **Posterbeiträge**

Schmidt S, Wundrack S, Frank C, Stosch R.: SI-Traceable Quantification of Specific Disease Related Biomarkers by Raman Spectroscopy, Nanotexnology Thessaloniki, Griechenland (2017)

Schmidt S, Luckau L,: Complex Measurands in Biological Systems: E-MRS Spring Meeting, Lille, Frankreich (2016)

Schmidt S, Stosch R, Güttler B,: Quantification of specific disease-related biomarkers by ID-Raman spectroscopy: International Summer School on Metrology, Kloster Drübeck (2015)

---

**In der Wissenschaft ist viel Gewisses,  
sobald man sich von den Ausnahmen  
nicht irre machen lässt und die Probleme  
zu ehren weiß**

**Johann Wolfgang von Goethe**

---

## Zusammenfassung

Die Hämoglobinkonzentration in Blut ist einer der am häufigsten gemessenen Parameter in der Labormedizin, dabei können in Abhängigkeit von den verwendeten Messmethoden voneinander abweichende Ergebnisse zustande kommen, die eine Vergleichbarkeit von Patientendaten erschwert. Für Hämoglobin ist die am häufigsten eingesetzte Messmethode die Cyanmethämoglobinmethode, die auf einer photometrischen Detektion basiert. Diese ist jedoch nicht auf das internationale Einheitensystem (SI) rückgeführt. Die Entwicklung von Referenzmessverfahren (RM), die eine metrologische Rückführbarkeit dieser und anderer bioanalytischer Messmethoden gewährleisten, ist daher in den letzten Jahren stark in den Vordergrund der Aktivitäten nationaler Metrologieinstitute gerückt.

In dieser Arbeit wurde daher versucht ein Immunoassay, basierend auf der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (surface enhanced Raman scattering, SERS), zu entwickeln, der als potenzielles RM dienen kann. Neben Hämoglobin soll es auch möglich sein die Konzentration anderer, auch sehr gering konzentrierter Proteine zu bestimmen. Die Kombination mit der Isotopenverdünnung (ID) ermöglicht präzise Messungen in selbst kleinsten Konzentrationsbereichen. Die Detektion des Hämoglobins erfolgt indirekt durch die Verwendung des ramanaktiven Markers 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) welcher auf Goldnanopartikeln (AuNP) mit einem Durchmesser von ca. 40 nm immobilisiert wurde. Neben DTNB in nativer Form wurde für die Durchführung der ID ebenfalls ein isotopenangereichertes Analogon von DTNB (DTNB\*) benötigt. Für einen erfolgreichen Immunoassay wurden weitere Funktionalisierungen der AuNP mit spezifischen monoklonalen Antikörpern und einem zertifizierten Hämoglobin mit bekannter Konzentration durchgeführt. Die Funktionalisierungen der AuNP wurden eingehend mit Verfahren wie der UV/Vis-Spektroskopie, der Agarose-Gelelektrophorese und der Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Sowohl die Funktionalisierungen der AuNP mit DTNB/DTNB\* (TNB/TNB\* bei erfolgreicher Funktionalisierung) als auch mit Antikörpern und Hämoglobin stellten sich als erfolgreich heraus. Der Nachweis der Spezifität von monoklonalen sowie polyklonalen Antikörpern für Hämoglobin wurde mittels der proteinanalytischen Methode der Gelelektrophorese überprüft und zeigte sich als ausreichend für die weitere Verwendung innerhalb des Immunoassays. Für die Realisierung der ID wurden die AuNP entweder mit DTNB (+ Antikörper, + Hämoglobin) oder mit DTNB\* (+ Antikörper, + Hämoglobin) in bestimmten äquidistanten Verhältnissen gemischt. Das höhere molekulare Gewicht des TNB\* führt zu einer Verschiebung der Raman-Spektren, die in Kombination mit den Mischungsverhältnissen eine Bestimmung der (unbekannten) Proteinkonzentration ermöglicht. Durch die Kenntnis der für die Mischungsverhältnisse verwendeten Mengen (Nanopartikel, DTNB und Hämoglobin) kann eine Berechnung der unbekannten Konzentration erfolgen. Um den AuNP-Komplex für den Aufbau eines Immunoassays auf einem geeigneten Trägermaterial zu immobilisieren, wurden verschiedene Oberflächen wie Cellulosenitrat-Membranen und Glaswafer getestet. Während der ersten Messungen

---

stellten sich Probleme in Bezug auf eine Aggregation der AuNP heraus, sodass die Cellulosenitrat-Membranen für eine Verwendung für den ID-SERS-Immunoassay nicht weiterverwendet werden konnten. Glaswafer hingegen zeigten sich als zielführend und ermöglichten die Erstellung eines ersten Testformates des SERS-Immunoassays sowie dessen Auswertung. Aufgrund der Problematik einer Aggregation der Partikel kann das Testformat des ID-SERS-Immunoassays nur eingeschränkt verwendet werden.

## **Abstract**

Haemoglobin is one of the most frequently measured parameters in laboratory medicine. The only approved method for the detection of haemoglobin concentration the cyanmethaemoglobin method is not traceable to the SI. In general, there are severe problems in comparability of results in clinical laboratories and they can vary depending on the used testing kit. Raising from the problem of this lacking comparability and traceability the scope of this research was the development of a SERS-Immunoassay in combination with the Isotope Dilution approach which, is capable of an SI traceable quantification of haemoglobin. The detection of haemoglobin was performed indirect due to the usage of the strong Raman active marker DTNB. The aimed quantification of haemoglobin required additionally an isotopic enriched analogue of this marker. The used spherical goldnanoparticles with a size of 40 nm were functionalized with DTNB and its isotopologue and specific antibodies targeted against haemoglobin. The functionalization could be proved with different methods like UV/Vis, SAXS and agarose gel-electrophoresis. The specificity between antibodies and haemoglobin was successfully tested with Western blotting. This nanoparticle antibody complex was able to specific bind the haemoglobin and could be immobilized on a functionalized nitrocellulose membrane. The nitrocellulose-based approach appeared not to be suitable for a further development of the Immunoassay and an alternative was chosen. Due to these reasons an alternative approach with modified glass slides was executed. The alternative approach managed to minimize potential nanoparticle aggregation. With the achieved spectra a first try for a successful calibration model was made but with some limitations of the model itself. There are noticeable differences between the model based on the nitrocellulose membrane and the slides. Despite the influences of the nanoparticles, the ID-SERS-Immunoassay can be the basis for a further improvement of the quantification model for haemoglobin.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung und Motivation.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Hintergrund und Theorie .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Die Funktionsweise eines Immunoassays und seine Detektionsmöglichkeiten .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Der Raman-Effekt .....</b>	<b>17</b>
<b>Einfluss der Molekülschwingungen auf den Raman-Effekt .....</b>	<b>20</b>
<b>Plasmonische Eigenschaften von Goldnanopartikeln .....</b>	<b>21</b>
<b>Plasmonische Kopplung von Nanopartikeln .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Oberflächenverstärkter Raman-Effekt .....</b>	<b>24</b>
<b>Elektromagnetischer Verstärkungseffekt .....</b>	<b>24</b>
<b>Chemischer Verstärkungseffekt .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Isotopenverdünnung und die Rückführbarkeit von Bioanalyten .....</b>	<b>25</b>
<b>Die Methode der Isotopenverdünnung und Kombination mit SERS .....</b>	<b>25</b>
<b>Der Laborparameter Hämoglobin .....</b>	<b>28</b>
<b>Rückführbarkeit von Messergebnissen in der Labordiagnostik .....</b>	<b>31</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Raman-Spektroskopie .....</b>	<b>33</b>
<b>Aufbau des Raman-Spektrometers .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Parameter zur Berechnung und Optimierung der Auswahl eines ramanaktiven Markers .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit DTNB/DTNB*, Antikörper und Hämoglobin .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 UV/Vis-Spektroskopie .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5 Röntgenkleinwinkelstreuung .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Proteinanalytik .....</b>	<b>42</b>
<b>3.7 Erstellung des Immunoassays: Funktionalisierung von Oberflächen .....</b>	<b>44</b>
<b>3.8 Rasterelektronenmikroskopie .....</b>	<b>46</b>
<b>3.9 Reflexionsmessungen .....</b>	<b>47</b>
<b>3.10 Erstellung einer Messreihe in Kolloid .....</b>	<b>48</b>
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB, als ramanaktives Markierungsreagenz .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2 Oberflächenfunktionalisierung der AuNP mit DTNB/DTNB* .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 Proteinanalyse mit Gelelektrophoreseverfahren .....</b>	<b>60</b>
<b>Native PAGE und Western Blot .....</b>	<b>60</b>

---

Spezifitätsnachweis mittels Dot Blot Verfahren .....	62
4.4 Funktionalisierung der Partikeloberflächen mit Antikörper und Hämoglobin .....	63
4.5 Funktionalisierungsnachweis der AuNP mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	68
4.6 SERS-Immunoassay .....	70
Reflexion der funktionalisierten Membranen mit immobilisierten AuNP-Komplexen .....	84
4.7 Glaswafer als Substrat für den Immunoassay .....	97
4.8 Messunsicherheiten in komplexen biologischen Systemen .....	107
5 Zusammenfassung und Ausblick .....	108
Literaturverzeichnis .....	112
6 Anhang .....	125
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	125
6.2 Symbolverzeichnis .....	127
6.3 Verwendete Geräte und Proteine .....	128
6.4 Ergänzende Daten und Informationen .....	129
Kontrollkarte für die Herstellung von Stammlösungen .....	129
Synthese von $^{15}\text{N}_2\text{DTNB}$ .....	130
Erstellung der Mischungsverhältnisse .....	131
SDS-PAGE mit Western Blot .....	133
6.5 Abbildungsverzeichnis .....	134
Danksagung .....	139



## 1. Einleitung und Motivation

In den vergangenen zwei Jahrzehnten haben komplexe Biomoleküle wie z.B. Proteine zunehmend Bedeutung als Biomarker erlangt, um eine möglichst frühe Diagnose von Krankheiten zu unterstützen oder den Therapieverlauf zu überwachen. In der heutigen Labormedizin werden Standardtechniken eingesetzt, um diese Biomarker in Körperflüssigkeiten zu detektieren und ihre Konzentrationen zu bestimmen. Diese Techniken werden in Test-Kits, sogenannten in-vitro-Diagnostika, zusammengefasst und basieren meist auf einem Immunoassay oder auf immunochemischen Methoden. Die hohe Diversität und Komplexität von Biomarkern können jedoch in Abhängigkeit vom jeweiligen Assay-Design zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Daher sind, um sowohl eine Rückführbarkeit und auch Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, Referenzmessverfahren notwendig<sup>1</sup>. Daher werden, um die Richtigkeit und die Vergleichbarkeit der durchgeführten Routinemessungen unabhängig vom verwendeten Messsystem sowie Zeit und Ort der Messung sicherzustellen, Referenzmessverfahren benötigt<sup>1-3</sup>.

Die Etablierung von international anerkannten Bezugspunkten besitzt dabei einen besonders großen Stellenwert. Ihre Realisierung erfolgt im Allgemeinen durch Messnormale, die auf das Internationale Einheitensystem (SI) rückgeführt sind und von nationalen Metrologieinstituten weltweit entwickelt und weitergegeben werden. Diese sog. primären Messverfahren stellen eine Realisierung der Definition einer SI-Einheit dar und gestatten die Bestimmung von Messgrößen mit einer hohen Richtigkeit und Präzision<sup>4</sup>. Obwohl die moderne Labordiagnostik eine immer bessere und genauere Detektion von krankheitsrelevanten Biomarkern und Parametern zur Überprüfung des Gesundheitszustandes eines Patienten zulässt, sind viele der verwendeten Routinemethoden nicht auf das SI rückführbar. Dadurch wird eine Vergleichbarkeit von Messwerten, besonders wenn sie mit Hilfe verschiedener Methoden durchgeführt werden, deutlich erschwert. Dies zeigt sich anhand von Vergleichsmessungen, die im Rahmen der externen Qualitätskontrolle in der Labormedizin von der Bundesärztekammer (BÄK) für eine Reihe von prioritären Analyten gefordert werden. Entsprechend einer von der BÄK herausgegebenen Richtlinie (Rili-BÄK) werden die Zielwerte bei diesen Vergleichsmessungen entweder durch einen methodenspezifischen Sollwert oder durch einen Referenzmethodenwert bestimmt<sup>5</sup>. Dabei zeigen sich oft große Abweichungen, sowohl zwischen den Resultaten der einzelnen Teilnehmer als auch vom Referenz- bzw. Sollwert. Zu den in der Rili-BÄK gelisteten prioritären Biomarkern zählt auch das Hämoglobin<sup>5-7</sup>. Hämoglobin stellt einen der weltweit am häufigsten gemessenen Laborparameter dar. Die Bestimmung der Konzentration dieses Parameters kann Aufschluss über eine Vielzahl an Krankheitsbildern eines Patienten geben. Die Standardmethode für die Konzentrationsbestimmung von Hämoglobin ist die Methämoglobin Methode (HiCN)<sup>8</sup>. Diese ist die bisher einzige von der BÄK und WHO anerkannte Detektionsmethode für Hämoglobin ist jedoch nicht auf das SI-rückführbar.

Ergebnisse von Labormessungen können aufgrund verschiedener Test-Kits, die von den Diagnostiklaboratorien verwendet werden, unterschiedlich sein und eine Vergleichbarkeit ist somit nicht gegeben. Die Testmethoden unterscheiden sich in ihren Grenzwerten (cut-off-Werte) innerhalb derer ein Patient beispielsweise als gesund oder krank eingestuft werden kann. Diese Lücke könnte ein neuartiges Testformat aus der Kombination der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS) mit der Isotopenverdünnung (ID) schließen. So können ebenfalls Probleme, die bei der Auswertung bisheriger Raman-Messungen vorhanden waren, wie eine geringe Effizienz, Reproduzierbarkeit und eine begrenzte Linearität, verringert werden<sup>9</sup>. Ziel ist es die Genauigkeit und Rückführbarkeit der ID mit der Empfindlichkeit der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie zusammenzuführen.

Ein erfolgreich validierter ID-SERS-Immunoassay hätte zudem das Potenzial nicht nur eine rückführbare Konzentrationsbestimmung von Hämoglobin zu ermöglichen, sondern auch auf andere Laborparameter angepasst werden zu können. Vorteilhaft ist dabei die Verwendung von spezifischen, gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpern, welche abhängig von dem zu messenden Parameter ausgetauscht werden können. Diese universelle Verwendung des ID-SERS-Immunoassays würde eine Vielzahl an möglichen Anwendungen bieten. Die Anwendung von SERS-Immunoassays reicht bisher von der medizinischen Diagnostik wie z.B. biomedizinischen Anwendungen, bildgebenden Verfahren über die Krebstherapie bis hin zu der Nutzung der plasmonischen Aktivitäten auf den Partikeloberflächen in der chemischen Analytik<sup>10</sup>. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz eines SERS-Immunoassays bietet die Möglichkeit niedrige Proteinkonzentrationen zuverlässig nachzuweisen und dies vielleicht mit einer Rückführbarkeit auf das SI<sup>1</sup>.

Das Hämoglobin soll in dem angestrebten Immunoassay indirekt durch die Verwendung eines ramanaktiven Markers 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) bestimmt werden. Der Vorteil bei der Verwendung eines Markers ist, dass geringe Intensitäten der konventionellen Raman-Spektroskopie, wie z.B. bei Hämoglobin, erhöht werden können und störende Einflüsse durch Verunreinigungen oder andere Proteine verringert werden können. Dies ist ebenfalls bei gering konzentrierten Zielanalyten vorteilhaft. Es wurden bereits SERS-Immunoassays beschrieben, die mit DTNB und anderen ramanaktiven Markern funktionalisierte AuNP verwenden<sup>11–14</sup>. Bei diesen Ansätzen wurde das durch den ramanaktiven Marker entstandene Raman-Signal nur für eine Identifikation des Zielanalyten eingesetzt. Zur Quantifizierung nach dem Prinzip der Isotopenverdünnung werden in dieser Arbeit die zur Signalverstärkung eingesetzten Goldnanopartikel (AuNP) dazu entweder mit DTNB oder einer iosotopologen Form von DTNB funktionalisiert. Infolge der Anreicherung des Isotopologs in <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N<sub>2</sub> und die damit verbundene Erhöhung der molaren Masse werden einzelne charakteristische Banden in den Raman-Spektren in Richtung der kleineren Wellenzahlen verschoben und so eine Auswertung von Isotopenverhältnissen ermöglicht. An diese AuNP wird dann über spezifische monoklonale Antikörper das Hämoglobin gebunden.

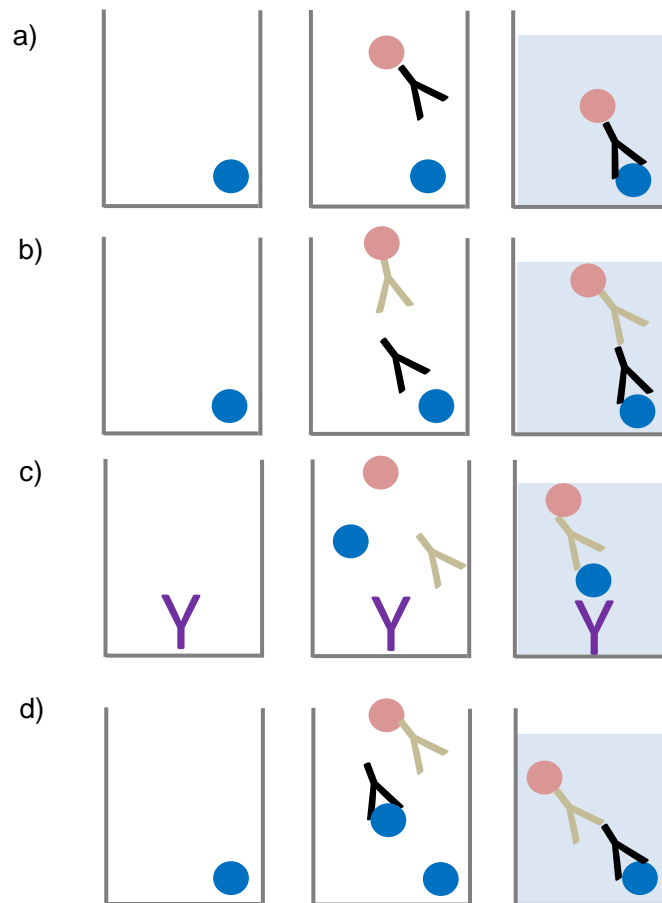
Die AuNP mit DTNB werden dabei mit einer Probe mit unbekannter Hämoglobin-Konzentration funktionalisiert und die mit dem DTNB-Isotopolog mit einer Probe mit bekannter Hämoglobin-Konzentration. Aus diesen funktionalisierten AuNP werden Mischungen in bestimmten Verhältnissen erstellt und die AuNP anschließend auf einer geeigneten mit einem polyklonalen Antikörper funktionalisierten Oberfläche immobilisiert. Aus den Verhältnissen zwischen der in einer genau bekannten Konzentration vorliegenden Referenz und der unbekannten Konzentration in der Probe können die unbekannte Konzentration und die beigeordneten Messunsicherheiten aus den gemessenen Intensitätsverhältnissen bestimmt werden.

## **2. Hintergrund und Theorie**

### **2.1 Die Funktionsweise eines Immunoassays und seine Detektionsmöglichkeiten**

Bereits in den 1950er Jahren begann die Entwicklung von Immunoassays. Sie bieten in der Forschung eine Vielzahl an Anwendungsgebieten und haben sich bereits in verschiedenen Forschungsbereichen etabliert<sup>15,16</sup>. Die Forschungsgebiete die einen Immunoassay für die Detektion von Biomarkern verwenden, reichen von der Biochemie bis hin zu medizinischen Anwendungen<sup>17</sup>. Immunoassays stellen im Allgemeinen analytische Methoden dar, die auf spezifischen und starken Wechselwirkungen zwischen einem Antigen und einer Erkennungsstruktur, meist einem markierten Antikörper, beruhen<sup>18</sup>. Ein Antigen stellt eine Substanz dar, die zu einer Immunantwort führt. Immunoassays weisen neben einer Spezifität, gegeben durch die Antigen-Antikörperreaktion, auch das Vermögen auf, eine große Menge an biologischen Proben in vielen Fällen schnell und kostengünstig zu analysieren<sup>17</sup>. Durch die Immobilisierung des zu untersuchenden Antigen-Antikörper-Komplexes ist eine einfache Abtrennung nicht bindender Komponenten durch Waschen möglich. So können Zielproteine in komplexen Matrices gezielt durch die Antigen-Antikörperreaktion gebunden werden und von den anderen verbleibenden Strukturen abgetrennt werden. Dies stellt einen deutlichen Vorteil in Bezug auf die spätere Signalauswertung eines Immunoassays dar und ermöglicht eine Quantifizierung des Antigens. Das gängige Detektions-Prinzip eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) oder auch generell eines Immunoassays liegt in der Bildung eines gefärbten Produkts. Die Reaktion, bei der ein Substrat zu einem Farbstoff umgesetzt wird, wird durch ein z.B. an einem zweiten Antikörper (sekundärer Antikörper) gebundenes Enzym katalysiert, dessen Konzentration sich in Abhängigkeit von der Konzentration des Antigens ändert, da er z.B. an dieses nach dessen Bindung an die immobilisierten Antikörper (primärer Antikörper) sandwichartig gebunden wird<sup>19</sup>. Der sekundäre Antikörper kann alternativ auch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sein.

Der Nachweis erfolgt häufig in so genannten „ELISA-plates“, kann aber auch auf anderen für den Ansatz geeigneten Oberflächen durchgeführt werden. Neben dem schon genannten Immuno-Sandwich-Assay gibt es noch andere Formate, welche in Abbildung 1a-d dargestellt sind.



**Abbildung 1:** Darstellung verschiedener Formen eines ELISA. Die blaue Kugel stellt den Analyten dar. Die Antikörper sind farblich je nach Funktion dargestellt, primäre „Fängerantikörper“ in schwarz und violett sowie der sekundäre in grau. Die rosa Kugel stellt das Enzym dar, das die Umsetzung eines Substrats katalysiert; a) stellt einen direkten ELISA dar, bei dem der Analyt auf der Oberfläche immobilisiert wird; b) stellt einen indirekten ELISA dar, bei dem das Antigen über eine Kaskade von zwei spezifischen Antikörpern detektiert wird; c) zeigt einen Immuno-Sandwich-Assay, bei dem der primäre Antikörper immobilisiert wird und d) einen kompetitiven ELISA. Abbildung verändert nach <sup>20</sup>.

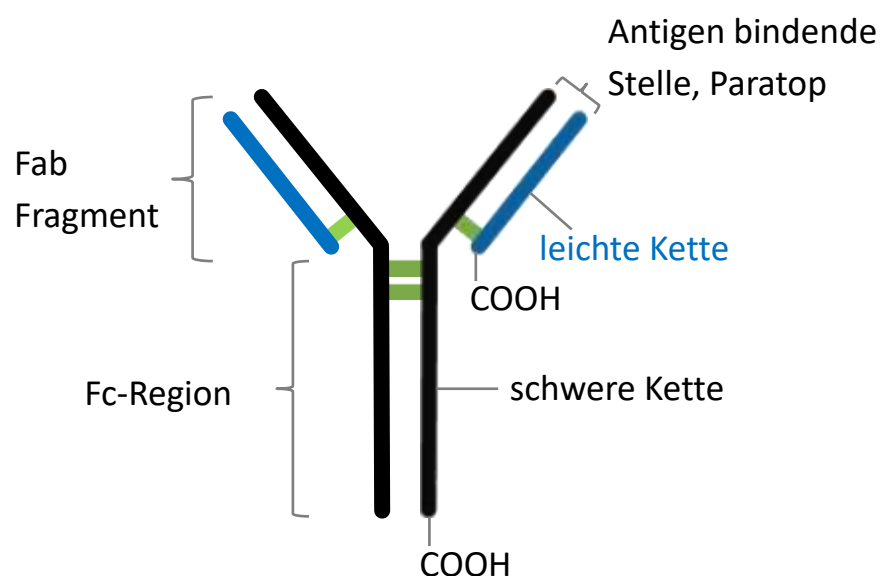
Bei der direkten Form des ELISA, Abbildung 1a, wird das Antigen auf der ausgewählten Oberfläche immobilisiert und ein mit einem Enzym konjugierter Antikörper führt zu der gewünschten Detektion. Dieser Ansatz ist im Vergleich zu den anderen Formen eines ELISA schneller und weist eine geringere Anfälligkeit gegenüber Kreuzreaktionen auf, da ein weiterer Antikörper fehlt<sup>19-21</sup>. Dahingegen liegt ein höherer Hintergrund als bei anderen ELISA Formen vor, sofern der Antikörper nicht sehr spezifisch ist. Dies wird dadurch begünstigt, dass das Antigen auf der Oberfläche bindet und so keine Selektion durch einen weiteren Antikörper erfolgt. Diese Variante wird häufig bei Analysen von Immunantworten verwendet<sup>19</sup>. Die Antigen-Detektion bei einem indirekten ELISA (Abbildung 1b) ist hingegen ein zweischrittiger Prozess, der einen weiteren Antikörper benötigt. Zunächst wird ein primärer nicht markierter Antikörper verwendet, um an das Antigen zu binden. Ein weiterer sekundärer Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, bindet wiederum an diesen. Dabei binden im Schnitt zwei sekundäre Antikörper an einen primären und führen zu einer Signalverstärkung<sup>19,20</sup>. Der indirekte ELISA weist eine größere Sensitivität auf. Zudem bietet die Verwendung eines sekundären Antikörpers eine größere

Flexibilität aber auch die Gefahr von stärker auftretenden Kreuzreaktionen was zu einem erhöhten Hintergrundsignal führen kann<sup>16,19–21</sup>.

Der Sandwich-ELISA, Abbildung 1c, stellt die Form der Anwendung dar, die der des angestrebten SERS-Immunoassays entspricht. Für die Durchführung eines Sandwich-ELISA ist es notwendig einen primären und sekundären Antikörper zu verwenden die gegen das gleiche Antigen gerichtet sind, jedoch möglichst nicht an die selben Epitope binden<sup>19–21</sup>. Der primäre Antikörper, der auch als „Fängerantikörper“ bezeichnet wird und auf dem Trägermaterial immobilisiert wird, dient dazu, den Analyten, welcher sich in einem Medium befindet, spezifisch zu binden. Der sekundäre Antikörper bindet ebenfalls an den Analyten, da er spezifisch an andere Epitope bindet als der primäre Antikörper. Durch eine nachgeschaltete Enzymreaktion kann anschließend ein Signal, das mit der Antigenkonzentration korreliert, erzeugt werden<sup>19,20</sup>. Dieser Ansatz ist besonders geeignet für die Analyse komplexer Systeme, da er eine hohe Sensitivität aufweist und so Analyten mit einer geringen Konzentration nachweisen kann<sup>19</sup>. Jedoch muss bei der Auswahl der Antikörper auf eine sehr gute Spezifität gegenüber dem Analyten geachtet werden, um die Qualität und gleichbleibende Ergebnisse zu erhalten. Abbildung 1d beschreibt einen kompetitiven ELISA. Es folgt eine Inkubation mit einem Antikörper, der den gleichen Analyten gebunden hat. Dabei konkurriert der Analyt-Antikörper-Komplex, der zugegeben wird, mit dem Analyten, der auf der Oberfläche immobilisiert wurde, um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen. Ein mit einem Enzym markierter Antikörper wird für den späteren Nachweis benötigt. Ungebundene Antikörper werden gewaschen. Das resultierende Signal weist eine inverse Korrelation zu der Menge des Analyten auf. Liegt der Analyt in einer hohen Konzentration vor, so fällt das Messsignal niedriger aus, da weniger enzymmarkierter Antikörper gebunden wurde<sup>19–21</sup>. In den letzten Jahren wurde der Problematik von Messunsicherheiten in Bezug auf Antikörper-basierte Assays und den Nachweis von nur gering konzentrierten Analyten mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Dadurch entstanden weiterführende Testformate, die beispielsweise in Kombination mit der Raman-Spektroskopie eingesetzt werden<sup>22</sup>.

## Antikörpercharakterisierung für den Immunoassay

Antikörper sind eines der wichtigsten Werkzeuge in der Bioanalytik. Sie ermöglichen die Detektion, Quantifizierung und die Erkennung von Veränderungen in Proteinen sowie deren Isolierung aus einer komplexen Matrix. In der Definition kann ein Antikörper beschrieben werden als ein „Immunglobulin, das in der Lage ist eine spezifische Bindung mit einem Antigen herzustellen, welches eine Immunantwort ausgelöst und induziert hat“, wie beispielsweise von Abcam beschrieben<sup>23</sup>. Die Bildung von Antikörpern erfolgt als Immunantwort auf das Eindringen von fremden Molekülen in den Organismus<sup>24</sup>. Die Form der Antikörper bzw. ihrer Untereinheiten kann als Y-förmig beschrieben werden. Es erfolgt eine Unterteilung in verschiedene Klassen (Immunglobuline IgA, IgM, IgD, IgE und IgG) die sich in ihrer Größe, der Zusammensetzung und ihrem Wirkungsort innerhalb des Organismus unterscheiden<sup>25</sup>. Jedoch ist ihnen allen gemeinsam, dass die Enden der Y-formenden schweren und leichten Untereinheiten, die antigen-spezifische Region des Antikörpers, die Paratope bilden, wohingegen die stetige Fc-Region als eine Art Werkzeug für Manipulationen und für eine Immobilisierung auf einem Substrat dienen kann. Der Antikörper der IgG Klasse, in Abbildung 2 schematisch dargestellt, zählt zu den am häufigsten in Organismen vorkommenden und in der Immunochemie verwendeten Antikörpern. Dieser hat eine molare Masse von 150 kDa und eine Ausdehnung von ca. 16 nm an den Fab-Fragmenten und von ca. 7 nm an den Fc-Regionen. Er besteht aus zwei schweren Ketten mit je 50 kDa und zwei leichten Ketten mit je 25 kDa<sup>26</sup>. Diese zwei identischen Polypeptidketten mit insgesamt 75 kDa sind an der hinge-Region über Disulfidbrücken miteinander verbunden<sup>16,27</sup>.



**Abbildung 2:** Darstellung eines IgG-Antikörpers. Ein typischer IgG-Antikörper besteht aus zwei leichten mit je 25 kDa (blau) und zwei schweren Ketten je 50 kDa (schwarz), welche über Disulfidbrücken (grün) miteinander verbunden sind. Die Fab Fragmente bilden die spezifischen antigenbindenden Regionen des Antikörpers. Die Fc-Region hingegen stellt eine stetige Region des Antikörpers dar und kann für die Immobilisierung auf Oberflächen genutzt werden.

Die Stärke der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen gibt Aufschluss über dessen Affinität gegenüber dem Antigen. Jede antigenbindende Stelle kann über kooperative physikalische Wechselwirkungen mit einem Antigen interagieren und dieses binden. Die Bindungen kommen durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen, elektrostatische Kräfte und van der Waals Kräfte zustande<sup>24</sup>.

Eine weitere Unterteilung der Antikörper erfolgt in polyklonal und monoklonal. Diese Bezeichnungen beziehen sich auf die Art der Herstellung der Antikörper und die damit verbundenen Eigenschaften. Als polyklonale Antikörper werden solche bezeichnet, die durch Immunisierung von Tieren gewonnen werden. Sie sind dadurch polyvalent hinsichtlich der Erkennung von Antigenen, können aber auch abhängig von dem jeweiligen Produktionszyklus in ihren Eigenschaften variieren. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern sind sie vernetzend, was für Präzipitationsmethoden genutzt werden kann. Als negativ zu betrachten ist dennoch, dass sie aufgrund ihrer großen Variabilität abweichende Ergebnisse und einen starken Hintergrund produzieren können<sup>24</sup>. Monoklonale Antikörper hingegen, die lediglich gegen ein Epitop gerichtet sind, weisen eine wesentlich bessere Spezifität auf, weshalb sie meist als primäre Antikörper verwendet werden. Die Herstellung dieser Antikörper erfolgt über die Fusionierung Antikörper-produzierender Zellen, aus Mäusen, mit Myelomzellen<sup>28</sup>. Der Vorteil monoklonaler Antikörper liegt darin, dass sie einheitlich sind und durch die Fusionierung von B-Lymphozyten mit HAT sensitiven Tumorzellen (Myelomzellen) eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit aufweisen<sup>28-30</sup>. Dadurch weisen sie eine gleichbleibende Spezifität gegenüber dem jeweiligen Antigen, mit dem das Tier immunisiert wurde, auf. Sie sind nicht vernetzend, hingegen relativ gut standardisierbar. Ferner gibt es noch rekombinante Antikörper, die wie Bibliotheken durch Neukombination von Untereinheiten gewonnen werden. Die Auswahl eines geeigneten Antikörpers ist aus diesen hier erwähnten Gründen von großer Bedeutung für den Erfolg eines Immunoassays. Da die Antikörper durchaus in den Eigenschaften in Bezug auf die jeweiligen Anwendungen von den Angaben des Herstellers abweichen können, ist es ratsam, diese vor der Verwendung in einem Immunoassay auf ihre Eignung zu überprüfen.



## 2.2 Der Raman-Effekt

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Methode ist die Raman-Spektroskopie, weshalb an dieser Stelle genauer auf die Theorie des Raman-Effekts und weiterführend die Plasmonik eingegangen werden soll. Bereits seit den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts, wurde auf dem Gebiet der Streuung von elektromagnetischer Strahlung intensiv geforscht und eine Vielzahl an neuen Erkenntnissen gewonnen. Der Compton-Effekt beschrieb bereits 1923 eine Wellenlängenänderung von Photonen, wenn sie an Elektronen gestreut werden. A. Smekal sagte einen analogen Effekt voraus, welcher einige Jahre später, 1928, durch C.V. Raman und K.S. Krishnan experimentell nachgewiesen werden konnte<sup>31,32</sup>. Zwei Jahre später wurde Raman daraufhin mit dem Nobelpreis in Physik für den nach ihm benannten Effekt ausgezeichnet. Zeitgleich wiesen Landsberg und Mandelstam den Effekt an Festkörpern nach<sup>33</sup>. Die Darstellung des Effekts kann sowohl klassisch durch die Beschreibung der Raman-Streuung sowie quantentheoretisch erfolgen.

Die theoretische Beschreibung von Streuprozessen von Photonen an Molekülen und Festkörpern kann durch die klassische Mechanik und die Quantenphysik erzielt werden, innerhalb des klassischen Ansatzes beschrieben durch ein induziertes Dipolmoment, das durch elektromagnetische Felder des auftreffenden Lichts hervorgerufen wird<sup>34</sup>. Da der Raman-Effekt ein unelastischer Streuprozess ist, weisen die Wellenlängen des Primärlichts und des gestreuten Lichts Unterschiede auf<sup>35</sup>. Es treten dabei neben der elastischen Strahlung, dem Rayleigh-Signal, welches der Einstrahlungsfrequenz  $\nu_0$  entspricht, Verschiebungen zu höheren, Anti-Stokes-, oder niedrigeren Stokes-Raman-Energien auf<sup>36</sup>. Dabei induziert das elektrische Feld  $\vec{E}$  ( $\vec{E} = \vec{E}_0 * \cos 2\pi\nu_0 t$ ) einer Lichtwelle im Streusystem ein Dipolmoment, welches sich wie folgt beschreiben lässt

$$\vec{\rho}_{\text{ind}} = \hat{\alpha} * \vec{E}, \quad (2.1)$$

$\hat{\alpha}$  ist der Polarisierbarkeits-Tensor,  $\vec{E}$  entspricht dem elektrischen Feld<sup>34</sup>. Die Polarisierbarkeit gibt an wie groß die Deformierbarkeit oder auch Verschiebbarkeit eines Moleküls, Atoms bzw. deren Elektronenhülle unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ist. Es erfolgt dadurch eine Verschiebung von Elektronenwolken<sup>12,34</sup>. Dies führt dazu, dass das induzierte Dipolmoment mit der Frequenz  $\nu_0$  schwingt und ebenfalls als eine elektromagnetische Strahlungsquelle fungiert<sup>34</sup>. Zu diesen Schwingungen kommen die Schwingungen des angeregten Moleküls oder Festkörpers hinzu<sup>12,34</sup>. Dies gilt für eine isotrope Polarisierbarkeit. Dabei entspricht  $\hat{\alpha}$  einem Skalar. Setzt man die o.g. Gleichungen für das elektrische Feld in Gleichung 2.1 ein so erhält man<sup>34</sup>

$$\rho_{\text{ind}} = \alpha * E_0 * \cos 2\pi\nu_0 t. \quad (2.2)$$

Das Dipolmoment und das eingestrahlte Licht besitzen die gleiche Schwingungsfrequenz. Diese Art der Streuung wird Rayleigh-Streuung genannt und ist eine elastische Streuung<sup>34</sup>. Eine Veränderung der Polarisierbarkeit kann ebenfalls durch mechanische Eigenschwingungen der Moleküle auftreten. Es erfolgen dadurch Frequenz-Änderungen der in Gleichung 2.2 beschriebenen Schwingung des Dipolmoments. Ist die Schwingung eine harmonische, ergibt sich für die Normalkoordinate  $Q$  Gleichung 2.3<sup>34</sup>.

$$Q = q_0 * \cos 2\pi\nu_r t \quad (2.3)$$

Dabei beschreibt  $\nu_r$  die Frequenz. Mit Hilfe einer Taylor-Reihe können Änderungen, welche die Molekülschwingungen auf die Polarisierbarkeit haben, beschrieben werden<sup>34</sup>

$$\alpha(Q) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_0}\right) Q + \text{Terme höherer Ordnung.} \quad (2.4)$$

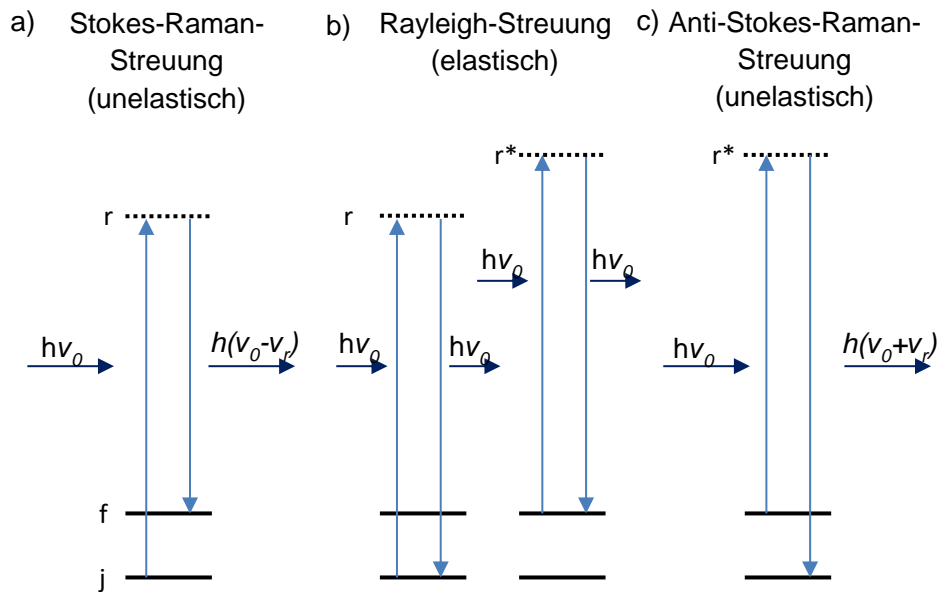
Wird diese Formel in Gleichung 2.2 sowie Gleichung 2.3 eingesetzt ergibt sich für das Dipolmoment, bis zur ersten Ordnung<sup>34</sup>.

$$\rho_{ind} = \left[ a_0 + \left(\frac{\partial a}{\partial q_0}\right) q_0 * \cos 2\pi\nu_r t. \right] * E_0 * \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2.5)$$

Durch das Auflösen der Kosinus-Funktionen mit einem trigonometrischen Additionstheorem ergibt sich folgende Gleichung 2.6 für die Rayleigh, Stokes-Raman und Anti-Stokes-Raman-Streuung<sup>34</sup>.

$$\begin{aligned} \rho_{ind} = & \alpha * E_0 * \cos 2\pi\nu_0 t && \text{Rayleigh-Streuung} \\ & + \frac{1}{2} E_0 q_0 \left(\frac{\partial a}{\partial q_0}\right) \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_r) t && \text{Stokes-Raman-Streuung} \\ & + \frac{1}{2} E_0 q_0 \left(\frac{\partial a}{\partial q_0}\right) \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_r) t && \text{Anti-Stokes-Raman-Streuung} \end{aligned} \quad (2.6)$$

Die in 2.6 dargestellte Formel verdeutlicht, dass aufgrund der Veränderungen des Dipolmoments durch die Schwingungen der Moleküle, neue Frequenzen hervorgerufen werden. Sie lassen sich mit  $\nu_0 - \nu_r$  für die Stokes-Raman-Streuung und  $\nu_0 + \nu_r$  für die Anti-Stokes-Raman-Streuung beschreiben<sup>12,34</sup>. Die verschiedenen Arten der Rayleigh- bzw. Raman-Streuung lassen sich am besten über ihre Energieschemata vergleichen, welche in Abbildung 3a-c dargestellt sind.



**Abbildung 3:** Die Abbildungen 3a-c stellen die unelastischen und elastischen Anteile der Raman-Streuung sowie die Rayleigh-Streuung schematisch dar. Abbildung verändert nach <sup>34</sup>.

Wird Licht als Teilchen betrachtet, findet bei der Stokes-Raman Streuung eine Übertragung der Energie des Photons auf ein Molekül statt (siehe Abbildung 3a). Das Molekül absorbiert ein Photon und wird dadurch in einen virtuellen Schwingungszustand gehoben. Durch die Abgabe eines Photons relaxiert dieses wieder<sup>34</sup>. Da sich das Molekül in einem angeregten (Schwingungs-)Zustand befindet, wird ihm die Energie  $h\nu_r$  übertragen.

Bei der gegenteiligen Anti-Stokes-Raman-Streuung befindet sich das Molekül bereits in einem angeregten Schwingungszustand und wird durch die Absorption eines Photons ebenfalls in einen virtuellen Schwingungszustand gehoben. Durch die Relaxation in den Grundzustand verliert das Molekül ein Photon mit der Energie  $-h\nu_r$ <sup>12,34,37,38</sup>. Insgesamt befinden sich nur wenige Moleküle in einem angeregten Schwingungszustand, weshalb die Anti-Stokes-Raman Streuung wesentlich seltener vorkommt als die Stokes-Raman-Streuung. Eine tatsächliche Wiedergabe der Intensitätsverhältnisse kann erst mit einer quantenmechanischen Betrachtung des Raman-Effektes unter der Verwendung der Schrödinger-Gleichung erfolgen, würde aber an dieser Stelle zu weit führen.

## Einfluss der Molekülschwingungen auf den Raman-Effekt

Spezifische Molekülschwingungen spielen in der Raman-Spektroskopie eine wichtige Rolle, denn deren Intensität und spektrale Lage sind von der Molekülsymmetrie und der chemischen Zusammensetzung abhängig<sup>39,40</sup>. Innerhalb eines Moleküls gibt es deshalb verschiedene Schwingungsmoden abgeleitet aus der Punktgruppensymmetrie. Die Lage der Schwingungsbanden hängt zu einem großen Teil von der Stärke der chemischen Bindungen innerhalb eines Moleküls ab, welche relativ einfach über ein Federmodell der klassischen Mechanik mit der Kraftkonstante  $k$  wiedergegeben werden kann (Gl 2.7).

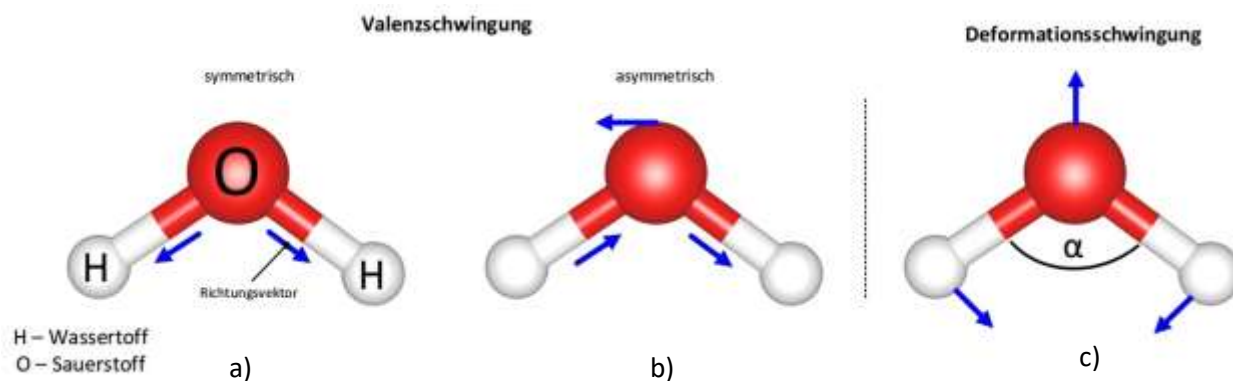
$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.7)$$

$\nu$  - Frequenz

$k$  – Kraftkonstante

$\mu$  – reduzierte Masse

Wird die Kraftkonstante größer, so verschiebt sich auch die Frequenz der Schwingung hin zu größeren Werten. Für die Identifizierung von ramanaktiven Schwingungen über die Punktgruppensymmetrie gibt es sogenannte Auswahlregeln, die dabei helfen das schwingungsspektroskopische Verhalten von Molekülen vorherzusagen<sup>41</sup>. Besitzt das betrachtete Molekül ein Symmetriezentrum, sind Schwingungen symmetrisch zu diesem Zentrum erlaubt<sup>39–41</sup>. Diese Polarisierbarkeitsänderung kann besonders an dreiatomigen Molekülen wie CO<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O deutlich gemacht werden. CO<sub>2</sub> weist eine symmetrische Valenzschwingung auf, welche ramanaktiv ist. Asymmetrische Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen, weisen hingegen keine Änderungen der Polarisierbarkeit auf und führen dazu, dass sie ramaninaktiv sind. Moleküle mit einem Symmetriezentrum können durch die Dipoländerungen nur ramanaktiv oder IR-aktiv sein, was durch das Alternativverbot beschrieben wird<sup>42</sup>. Liegt ein dreiatomiges gewinkeltes Molekül vor, so gilt das gleiche Prinzip. Führt eine symmetrische Valenzschwingung zu einer Veränderung des Polarisierbarkeitsellipsoids so liegt eine ramanaktive Schwingung vor wie am Beispiel von H<sub>2</sub>O in Abbildung 4 deutlich wird.



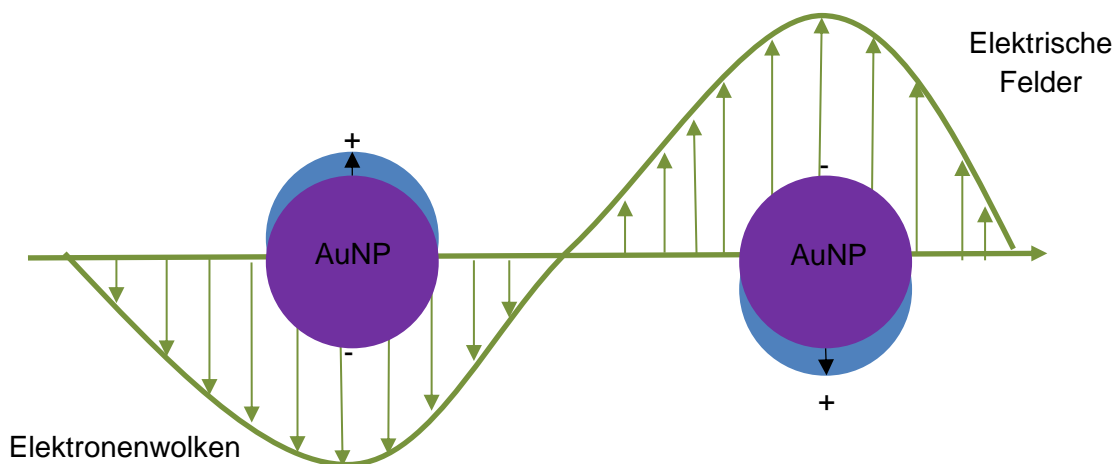
**Abbildung 4:** Ramanaktive Schwingungen dreiatomiger Moleküle am Beispiel von  $\text{H}_2\text{O}$ . Bei allen drei Schwingungsmoden (a-c) kommt es zu einer Veränderung des Polarisationsellipsoids.

Erfährt das Molekül wie in Abbildung 4a eine Größenänderung des Polarisierbarkeitsellipsoids ist es ramanaktiv. Für den Fall einer asymmetrischen Valenzschwingung erfolgt eine Richtungsänderung und bei der Deformationsschwingung eine Veränderung der Form des Ellipsoids. Substituenten, wie z.B. Nitrogruppen, Hydroxygruppen, Aminogruppen, Carbonylgruppen bzw. Aromaten unterscheiden sich in ihrem Schwingungsverhalten fundamental durch die unterschiedliche molekulare Symmetrie und die damit einhergehenden vibronischen Auswahlregeln. Dadurch unterscheiden sich die genannten Substituenten deutlich in ihren Schwingungszuständen, woraus die unterschiedlichen Raman-Spektren resultieren. Diese Eigenschaften bezeichnen auch den spektralen Fingerabdruck in den Raman-Spektren. So zeigen beispielsweise Nitrogruppen im Bereich von  $1350\text{ cm}^{-1}$ , Carbonylgruppen bei  $1670$  bis  $1800\text{ cm}^{-1}$ , Alkohole bei  $1000$  bis  $1150\text{ cm}^{-1}$  und Nitrile bei  $2210$  bis  $2260\text{ cm}^{-1}$  sehr starke Streckschwingungen.

## Plasmonische Eigenschaften von Goldnanopartikeln

Metallische Nanopartikel absorbieren in verschiedenen Spektralbereichen elektromagnetische Strahlung. Dies hat z.B. dazu geführt, dass die Partikel zum Färben von Glasfenstern in europäischen Kirchen verwendet wurden<sup>12,43</sup>. Dieser Effekt der Wechselwirkung, wird durch die Plasmonik beschrieben<sup>44</sup>. Dabei ist die dielektrische Funktion eines Materials ausschlaggebend für die Reaktion auf die elektromagnetische Anregung<sup>37</sup>. Für diesen Ladungstransfer in Metallen wurde bereits Anfang 1900 von Paul Drude ein Modell entwickelt, welches später von Arnold Sommerfeld quantenmechanisch weiter geführt wurde<sup>45,46</sup>. Die Leitungselektronen bewegen sich, in dem Drude-Modell unbeeinflusst voneinander in einem Metall (z.B. Metall-Nanopartikel). Durch Zusammenstöße mit Gitterionen oder Elektronen kann die Richtung ihrer Bewegung geändert werden<sup>12,38,44</sup>.

Die unbeweglichen Atomrümpfe, welche positiv geladen sind, bilden ein starres Ionengitter. Trifft eine elektromagnetische Strahlung (z.B. Laserlicht) auf die Leitungselektronen, werden diese durch das einwirkende oszillierende elektrische Feld beschleunigt und im Resonanzfall erfolgt eine kollektive kohärente Elektronenschwingung (Plasmon)<sup>47,48</sup>. Durch die Coulomb-Kraft der Gitterionen wirkt auf die Elektronen eine Rückstellkraft. Dadurch beginnen die Elektronen mit einer gewissen Frequenz zu schwingen. Die Schwingungsfrequenz des Plasmons hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie der Größe und Form der AuNP sowie der materialspezifischen dielektrischen Funktion des umgebenden Mediums sowie der Metall-Nanopartikel ab. Die Phasenverschiebung, die das System erfährt, ist in Abbildung 5 zu erkennen.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung eines sphärischen Nanopartikels und der Oberflächen-Plasmonenresonanz dieser. Abbildung verändert nach<sup>48</sup>.

Die Ausbreitung der Plasmonen ist jedoch begrenzt, weshalb sie als lokalisierte Oberflächenplasmonen bezeichnet werden. Diese lokalisierten Oberflächenplasmonen von AuNP lassen sich aufgrund der geringen Partikelgröße besonders gut durch elektromagnetische Strahlung zu phasengleichen Schwingungen anregen<sup>37,43,44,48</sup>.

## Plasmonische Kopplung von Nanopartikeln

Befinden sich zwei metallische Nanopartikel in einem sehr kleinen Abstand zueinander können sich ihre elektrischen Felder überschneiden. Daraus resultiert eine Wechselwirkung der lokalisierten Oberflächenplasmonen der Partikel. Die resultierenden Plasmonenmoden weisen andere Energien auf als einzelne Nanopartikel<sup>37,44</sup>. Auch weist die Polarisierbarkeit der elektrischen Felder zwischen den Nanopartikeln eine Richtungsabhängigkeit auf<sup>37</sup>. Bei auftreffendem speziell polarisiertem Licht erfolgt je nach Polarisationsorientierung eine polarisationsabhängige Umorientierung der elektrischen Felder zwischen den Nanopartikeln. So kann z.B. der angeregte Zustand zweier gekoppelter Partikel, ein Dimer, in zwei Energieniveaus unterteilt werden. Die Energieniveaus liegen dabei oberhalb und unterhalb von denen eines einzelnen Metall-Nanopartikels. Die verschiedenen energetischen Fälle, die auftreten können, zeigen dabei die Ausrichtung der Dipolmomente gegeneinander. Die Ausrichtung der gekoppelten Partikel kann dabei symmetrisch oder asymmetrisch sein. Die longitudinale Mode, bei einer symmetrischen Ausrichtung, führt zu einer Energieabsenkung und die transversale hingegen zu einer Erhöhung der Energie. Eine Anregung der Moden ist nur dann möglich, sofern diese nicht gegenseitig ausgelöscht werden. Die Energie der Kopplung wird neben der Ausrichtung der Nanopartikel auch von der Dielektrizitätszahl des Mediums und dem Abstand der Partikel zueinander beeinflusst<sup>37,44</sup>.

Bei einer Abnahme des Partikelabstands zwischen den Dimeren, steigt auch die Kopplungsenergie. Sind die Partikelabstände zueinander kleiner als der halbe Durchmesser eines Partikels, so können auch weitere Moden an den Wechselwirkungen teilnehmen. Diese können einen geringeren Einfluss haben<sup>49,50</sup>. Die Kopplungsenergie nimmt dadurch bei kleiner werdenden Abständen exponentiell zu<sup>37,38</sup>. Das elektrische Feld im Bereich zwischen den Partikeln wird dadurch verstärkt. Die Intensität des elektrischen Feldes zwischen den Partikeln kann dadurch um das bis zu 400-fache erhöht werden<sup>12,37</sup>. Diese Erhöhung steht in Zusammenhang mit den lokalisierten Resonanzen von Oberflächenplasmonen und korreliert daher mit der Extinktion der Partikel. Die Feldverstärkung bzw. Nahfeldverstärkung ist an dieser Stelle essenziell, da sie auch zu der Verstärkung der Raman-Streuung beiträgt, was für diese Arbeit besonders wichtig ist. Die Raman-Verstärkung geht in diesem Fall mit  $|E|^4$  ein<sup>37</sup>.

## 2.3 Oberflächenverstärkter Raman-Effekt

Die plasmonischen Eigenschaften der AuNP können dazu genutzt werden, die Raman-Signale von Molekülen zu verstärken, wenn sich diese in der Nähe der Partikel befinden<sup>51</sup>. Diese sogenannte oberflächenverstärkte Raman-Streuung wurde bereits vor über 35 Jahren von Fleischmann beschrieben<sup>52</sup>, welcher den Effekt der Adsorption von Pyridin an einer Silberelektrode beschrieb. Die Raman-Intensität konnte er bei diesem Versuch um das bis zu  $10^6$  fache erhöhen, deutete ihn jedoch nicht richtig. Einige Zeit später wurde dieser Effekt von Van Duyne<sup>53</sup> und Creighton<sup>54</sup> so gedeutet, dass die Zunahme der Intensität durch eine vergrößerte Oberfläche erfolgt. Daraufhin wurde die Unterteilung des Effekts in eine elektromagnetische und chemische Verstärkung beschrieben<sup>12,37,55–58</sup>.

### Elektromagnetischer Verstärkungseffekt

In Bezug auf die zuvor beschriebene plasmonische Kopplung von Nanopartikeln lässt sich eine Aussage über den Verstärkungsfaktor  $V$  treffen. Dieser Faktor hängt von verschiedenen Einflüssen des lokalen elektrischen Feldes, der Anregungsfrequenz und auch von der verschobenen Stokes-Frequenz  $\omega'$  ab und lässt sich mit folgender Formel beschreiben<sup>12,59</sup>:

$$V = |\vec{E}(\omega)|^2 |\vec{E}(\omega')|^2 \quad (2.8)$$

Auf das Molekül hat dabei nicht nur das elektromagnetische Feld der Strahlung Einfluss, sondern auch das an dem Partikel elastisch gestreute elektromagnetische Feld. Dieses ist jedoch abhängig von dem Abstand  $d$  des Moleküls zu dem Nanopartikel und wird mit  $1/d^3$  geringer<sup>12,59</sup>. Befindet sich ein Molekül nahe der Oberfläche eines Nanopartikels, so nimmt auch die elektromagnetische Verstärkung zu und resultiert in einer höheren Raman-Intensität des Moleküls<sup>12</sup>. Daher ist es von Vorteil für den Verstärkungseffekt, wenn das Molekül an der Oberfläche eines Nanopartikels bindet<sup>60</sup>. Eine weitere Erhöhung der Raman-Streuung des Moleküls erfolgt dadurch, dass die Emission der Partikel als eine Art „Antenne“ fungiert. Die Energie dabei stammt von dem induzierten Dipol im Molekül<sup>12</sup>. Ein plasmonischer Resonator führt zu der Änderung des elektromagnetischen Feldes mit einer Frequenz von  $\omega'$ . Die Wahrscheinlichkeit einer Raman-Streuung steigt, wenn das Molekül während eines bestimmten Zeitfensters angeregt wird. Besitzen Partikel nur eine geringfügige Dämpfung, stellen sie ein besonders geeignetes Substrat für SERS dar, da sie einen hohen Streuquerschnitt aufweisen. Durch die Anregung mit einem Laser werden diese Partikel nur geringfügig erhitzt und die Streuung der Photonen weist eine hohe Effizienz auf<sup>12</sup>.



Die Verstärkung ist besonders dann effektiv, wenn die Partikel einen sehr geringen Abstand, von ca. 2 nm, zueinander aufweisen und eine plasmonische Kopplung der AuNP erfolgt. Dadurch bilden sich „Hot-Spots“ aus. Innerhalb der Hot-Spots treten besonders hohe elektrische Feldstärken auf<sup>12</sup>.

### **Chemischer Verstärkungseffekt**

Effekte, die zu der Erhöhung der Raman-Intensität beitragen aber nicht durch den elektromagnetischen Ansatz zu begründen sind, fallen unter die Erklärung eines chemischen Verstärkungseffekts<sup>37</sup>. Im Vergleich mit der elektromagnetischen Verstärkung fällt diese mit einem Einflussfaktor von  $10^2$  niedriger aus. In diesen Verstärkungsfaktor fließen Veränderungen der Vibrationen und Rotationen des adsorbierten Moleküls ein. Hervorgerufen werden diese Veränderungen durch Überschneidungen von Wellenfunktionen des Moleküls und denen der Nanopartikeloberfläche<sup>12,37</sup>. So kann es zwischen der Oberfläche der Nanopartikel und dem adsorbierten Molekül neben lokalisierten Resonanzeffekten auch zu einem Ladungstransfer kommen<sup>60</sup>. Insgesamt sind der Einfluss des elektromagnetischen Verstärkungseffekts und der des chemischen nicht eindeutig voneinander zu trennen und es wurde in den letzten Jahren viel Forschung betrieben, um diese näher beschreiben zu können<sup>61</sup>. Sowohl der elektromagnetische als auch der chemische Verstärkungseffekt fließen in die SERS-Spektren ein.

## **2.4 Isotopenverdünnung und die Rückführbarkeit von Bioanalyten**

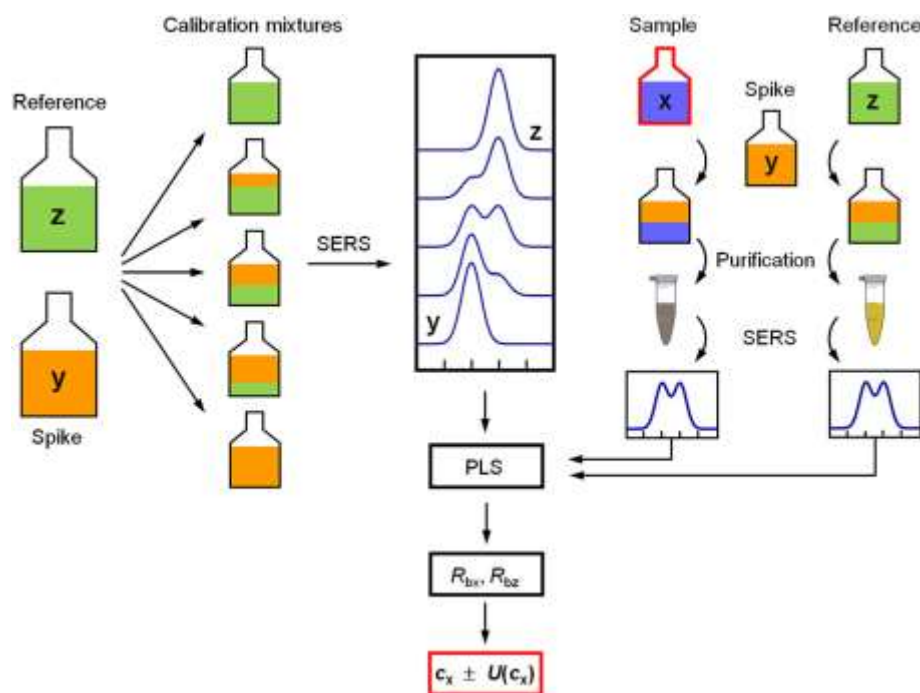
### **Die Methode der Isotopenverdünnung und Kombination mit SERS**

Die Bestimmung der Konzentration eines Analyten mithilfe des Isotopenverdünnungsverfahrens beruht auf der Bestimmung eines Analyten in seiner natürlichen isotopologen Form, aber unbekannter Menge, dem eine bekannte Menge eines Spikes als interner Standard zugesetzt wird. Der Spike entspricht dabei dem Analyten, jedoch in einer abweichenden isotopologen Zusammensetzung<sup>62</sup>.

Die daraus entstehende Mischung spiegelt zunächst ein Verhältnis wider, anhand dessen mit bekannter Konzentration des isotopenangereicherten Standards die unbekannte Konzentration des Analyten bestimmt werden kann. Bei homogenen Mischungen von Analyt und Spike können potenzielle Verluste des Analyten vernachlässigt werden, da die Messgröße, die Isotopenverhältnisse in jeder Teilproben der Mischung stets gleich sind<sup>62</sup>. Wird bei der anschließenden Detektion ein gegenüber dem Analyten empfindliches Messverfahren eingesetzt, so lässt sich beispielsweise die Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) als eine (primäre) Referenzmethode für die Konzentrationsbestimmung von Analyten einsetzen<sup>62,63</sup>. Trotz der vielen Vorteile der IDMS müssen auch einige nachteilige Faktoren bedacht werden. Dazu zählen, dass sie eine destruktive Methode ist und eine Durchführung nur realisiert

werden kann, sofern ein isotonenangereichertes Analogon des Analyten verfügbar ist. Zusätzlich, sollte das Erreichen eines tatsächlichen Gleichgewichts der Isotopenverhältnisse durch eine notwendige Vorbereitung der Proben erzielt und nachgewiesen werden<sup>62,64</sup>. Trotz dieser Nachteile stellt die IDMS eine der wenigen anerkannten Methoden für eine SI-rückführbare Konzentrationsbestimmung eines Analyten dar<sup>65,66</sup>. Viele nationale Metrologieinstitute haben auf Grundlage dieser Methode ihre nationalen Standards im Bereich der analytischen Chemie gebildet<sup>4,9</sup>.

Aus metrologischer Sicht betrachtet ist es jedoch sinnvoll, eine weitere Methode zur Verfügung zu haben, die auf einem anderen physikalischen Prinzip beruht<sup>9</sup>. Die Betrachtung und Lösung von chemisch-analytischen-Problemen mit unterschiedlichen Messtechniken bietet die Möglichkeit, einen besseren Überblick über die Einflussfaktoren, die einen Beitrag zu der Messunsicherheit leisten, zu bekommen und so die Verlässlichkeit der Methoden zu erhöhen<sup>9,67</sup>. Eine dieser alternativen Methoden, die das Messen von Isotopenverhältnissen ermöglicht, ist die Raman-Spektroskopie. Durch die Verwendung des isotonenangereicherten Analogons, die mit einem erhöhten molekularen Gewicht einhergeht, sind die Raman-Spektren zu kleineren Wellenzahlen verschoben. So kann die unbekannte Menge des Analyten anhand von Intensitätsverhältnissen und den bekannten Mengen des zuvor zugesetzten Spikes bestimmt werden. Dieser Ansatz der Kombination aus ID und SERS verbindet somit eine hohe Sensitivität mit den Vorteilen der Verhältnismessung. Ferner ist dieser Ansatz im Gegensatz zu der IDMS unabhängig von der Massenauflösung und ermöglicht ebenfalls die Erfassung struktureller Modifikationen von Molekülen. Dies ist besonders vorteilhaft bei der Untersuchung großer Biomoleküle. ID-SERS bietet somit die Möglichkeit für die Realisierung von Referenzmessverfahren<sup>9,68</sup>. Das Prinzip dieses Ansatzes lässt sich mit Hilfe der folgenden Abbildung 6 darstellen. Sie soll als Grundlage für die vorgenommenen Veränderungen bei der Kombination der ID mit SERS dienen.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der ID. Zunächst werden Kalibrierlösungen bestehend aus Referenz z und dem Spike y hergestellt. Die Messungen der Kalibrierlösungen ergeben ein PLS-Vorhersagemodell. Die Probe (x) und Referenz (z) werden jeweils mit dem Spike gemischt. Die Messungen der Spektren ergeben die Isotopenverhältnisse  $R_{bx}$  (Probe) und  $R_{bz}$  (Referenz) werden in die Analytkonzentration mit der Unsicherheit  $c_x \pm U(c_x)$  umgewandelt. Abbildung übernommen von <sup>68</sup>.

Die Erstellung eines Vorhersagemodelles erfolgt unter Verwendung der gesamten Spektren mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse, in diesem Fall mittels Partial Least Squares (PLS) Regression. Dieses PLS-Modell wird generiert aus den Spektren eines Satzes von Kalibrierlösungen, welche aus Stammlösungen des Analyten und des Spikes hergestellt werden. Diese Lösungen werden unter Beachtung metrologischer Standards aus dem Referenzmaterial des zu bestimmenden Analyten (z) und dem isotonenangereicherten Analogon (y) mit bekanntem Stoffmengenanteil in Schritten zwischen 0 und 1 erstellt, welche äquidistante Werte aufweisen sollten. Für die Probenanalyse werden nicht nur die Probe (x), sondern auch die Referenz (z), die ein zertifiziertes und wenn möglich rückgeführtes Material darstellt, mit dem Spike versetzt. Der Spike wird dabei in gleichen Mengen zu der Probe und der Referenz gegeben. Die Menge des Analyten wird dabei iterativ einem exact matching point angenähert, bei dem das Isotopenhäufigkeitsverhältnis gleich ist. Durch das exact matching Verfahren, kann sichergestellt werden, dass mögliche Einflüsse des Spike-Materials auf die Unsicherheitsbetrachtung vernachlässigt werden können. Die SI-Rückführbarkeit des Verfahrens ist durch die Verwendung eines zertifizierten Referenzmaterials gegeben. Sofern eine erste Schätzung  $c_x$  basierend auf dem Isotopenverhältnis  $R_{x/z}$  zielführend erscheint, wird dieser Wert als Ausgangspunkt für eine weitere Annäherung verwendet. Dabei wird der Durchlauf mit neuen Konzentrationen für den Spike und die Referenz wiederholt. Häufig können in einem zweiten Durchlauf bereits gute Ergebnisse erzielt werden, die nahe an dem wahren Wert der Analytkonzentration liegen<sup>9,67,68</sup>. Es ist dann nützlich, einen zweiten Ansatz an Referenzlösungen zu erstellen, die näher an einem äquimolaren Verhältnis zueinander sind. Ausgehend von diesen Bedingungen lässt sich das Ergebnis mit der folgenden Formel 2.9 berechnen.

$$w_x = w_z * \frac{m_z m_{yx}}{m_x m_{yz}} * \frac{\frac{\dot{x}_{bx}}{(1 - \dot{x}_{bx})}}{\frac{\dot{x}_{bz}}{(1 - \dot{x}_{bz})}} \quad (2.9)$$

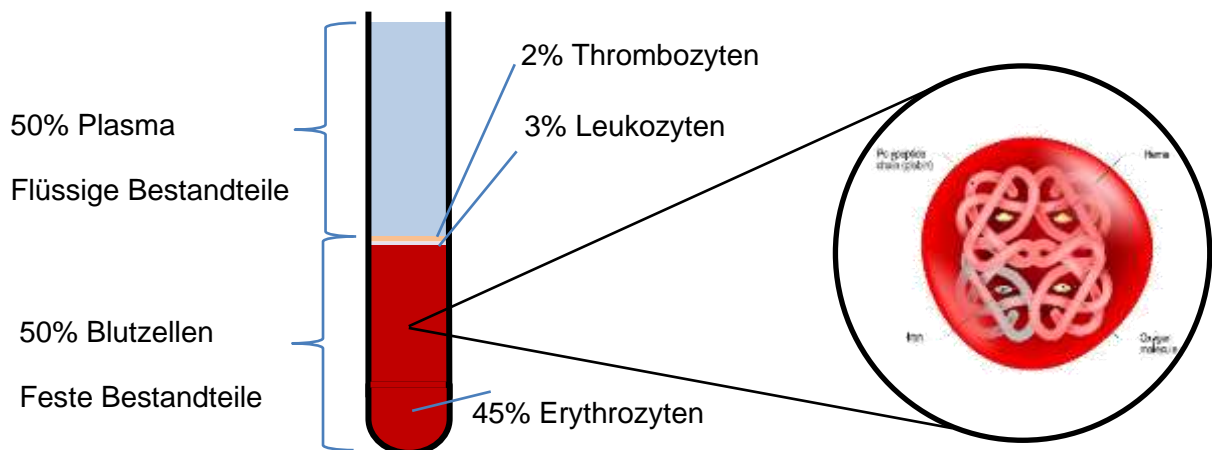
Bei dieser Rechnung entsprechen  $m_x$  und  $m_z$  den Massen der Probe und der Referenz. Diese werden durch die Mischung mit dem Spike zu  $m_{yx}$  und  $m_{yz}$ . Dabei beschreiben  $w_x$  und  $w_z$  die Massenanteile der Probe und der Referenz. Die Stoffmengenanteile der Probe und der Referenz werden durch  $\dot{x}_{bx}$  und  $\dot{x}_{bz}$  beschrieben. Unter Beachtung der Dichte des jeweiligen Analyten und der molaren Masse kann die molare Konzentration berechnet werden, wie in Gleichung 2.10 dargestellt

$$c_x = \frac{\rho_z}{M_x} * w_x. \quad (2.10)$$

Dieses Testformat der ID-SERS kann mit jedem Analyten durchgeführt werden, von dem ein geeignetes isotonenangereichertes Material zur Verfügung steht und welcher aufgrund seiner molekularen Struktur spontan mit dem signalverstärkenden metallischen Substrat bzw. Metall-Kolloid eine Bindung eingeht. Die in dieser Arbeit umgesetzte ID beruht auf der Verwendung eines ramanaktiven Markers in nativer und isotopolog angereicherter Form. Der Marker, der auf den AuNP gebunden wird und mit dem Antikörper gekoppelten Analyten beladen ist, wird in diesem Fall genauso wie das in Abbildung 6 dargestellte isotopolog angereicherte Zielmolekül eingesetzt. Durch die Verwendung eines Markers, der mit unterschiedlichen Antikörpern und den entsprechenden Analyten gekoppelt werden kann, kann dieses Testformat für einen Nachweis einer Vielzahl an Zielmolekülen dienen und bietet ein breites Anwendungsspektrum.

## Der Laborparameter Hämoglobin

Der menschliche Körper enthält in Abhängigkeit von Größe und Gewicht zwischen 5 und 6 L Blut. Blut ist eine komplexe Matrix, die aus verschiedenen Mikro- und Makromolekülen besteht, dem Transport von Nährstoffen durch den Körper dient und bei der Regulation der Temperatur sowie der Beseitigung von Giftstoffen aus dem Organismus hilft<sup>69,70</sup>. Blut kann zunächst in einen flüssigen Bestandteil, das Plasma, und in einen festen Bestandteil, der die Blutzellen enthält, unterteilt werden. Das flüssige Plasma besteht größtenteils aus Wasser, Nährstoffen, Hormonen und Proteinen. Die festen Bestandteile des Blutes bestehen zu 2% aus Thrombozyten, zu 3% aus Leukozyten und zum größten Teil aus Erythrozyten, wie in Abbildung 7 dargestellt<sup>69-71</sup>.



**Abbildung 7:** Humanes Blut setzt sich zusammen aus ca. 50 Vol.-% fester Bestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Die flüssigen bzw. gelösten Bestandteile wie Serum und Fibrinogene stellen die weiteren rund 50 Vol.-% des Plasmas dar. Die Struktur von Hämoglobin zeigt den tetrameren Aufbau mit jeweils zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten.

Die Erythrozyten enthalten den roten Blutfarbstoff Hämoglobin<sup>72</sup>, welcher den Sauerstofftransport innerhalb des Organismus und gleichzeitig den Abtransport von Kohlendioxid über die Lungen ermöglicht. Der Aufbau von Hämoglobin folgt einer tetrameren Struktur (siehe Abbildung 7) bestehend aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ - Untereinheiten mit je einer sauerstoffbindenden Hämgruppe<sup>73</sup>. Die Hauptbestandteile adulten Hämoglobins stellen HbA0 mit 97,5% und mit nur 2,5% das HbA2 dar. Die funktionellen Eigenschaften von Hämoglobin sind hauptsächlich bestimmt durch die charakteristische Faltung der Aminosäureketten der Globine, welche sich zu Helices formen und das Tetramer bilden. Diese vier Polypeptide des Hämoglobin-Tetramers binden jeweils eine prosthetische Hämgruppe, ein Porphyrinsystem mit Eisen als Zentralatom<sup>71,73</sup>. Das Eisen ist in der physiologischen Form als  $\text{Fe}^{2+}$  gebunden<sup>74</sup>. Die Bestimmung der gesamten Hämoglobinkonzentration hat sich als einer der wichtigsten Parameter in der klinischen Diagnostik herausgebildet und gibt weitreichenden Aufschluss über den Gesundheitszustand eines Patienten. Der Normbereich der Hämoglobinkonzentrationen für Frauen liegt bei 12,0 – 15,5 g/dL (7,5-9,6 mmol/l) und für Männer bei 14,0 – 17,5 g/dL (8,7-10,9 mmol/l)<sup>75</sup>. Abweichungen von diesen Werten können erste Anzeichen für eine bestehende oder beginnende Krankheit sein, wobei zeitweilige Schwankungen des Wertes vorkommen können, die sich meistens wieder normalisieren<sup>71</sup>. Treten diese Abweichungen jedoch über einen längeren Zeitraum auf oder sind sehr groß, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Zu tiefe Hämoglobin-Konzentrationen können auf Anämien, eine gestörte Erythrozytenbildung, eine Eisenverwertungs-Störung, Medikamenteneinnahme oder Tumorerkrankungen hinweisen. Andererseits können auch erhöhte Hämoglobin-Konzentrationen auf Krankheiten wie Erythrozytosen bzw. Polyglobulien hindeuten<sup>67,70</sup>. Jedoch kann es bei der Bestimmung der Hämoglobin-Konzentrationen in den einzelnen Laboratorien zu unterschiedlichen Messergebnissen kommen. Dieses Problem wird durch die Verwendung von unterschiedlichen Test-Methoden begünstigt<sup>5</sup>. Insbesondere ist Hämoglobin für den Sauerstofftransport verantwortlich<sup>73</sup>. Dieser ist essenziell im menschlichen Körper und reagiert empfindlich auf äußere und organelle Einflüsse. Dies kann schnell zu Fehlfunktionen und Krankheiten bei Betroffenen führen und

eine sorgfältige Überwachung von Patienten notwendig machen, um schnell und effektiv helfen zu können. Durch standardisierte Testverfahren in medizinischen Laboratorien kann dies bei jeder Blutuntersuchung realisiert werden.

Zu den klassischen Methoden der Konzentrationsbestimmung von Hämoglobin zählen die Bestimmung der Sauerstoff- oder der Kohlenmonoxid-Aufnahmefähigkeiten oder des Eisengehalts. Diese Methoden haben sich jedoch als wenig zuverlässig herausgestellt<sup>76</sup>. Aus diesem Grund wird größtenteils die Methämoglobin-Methode (cyanmethemoglobin method, HiCN), die alle Hämoglobin-Formen umfasst und zu einer Art Gold-Standard geworden ist, verwendet. Die HiCN Methode, ist die bisher einzige international anerkannte konventionelle Methode für die exakte Bestimmung der Konzentration von Hämoglobin. Das International Council for Standardization in Haematology (ICSH) hat bereits 1995 ein Referenz-Protokoll für die HiCN-Methode erstellt, das von der World Health Organization (WHO) empfohlen wird<sup>77,78</sup>. Die HiCN-Methode ist auch als Drapkin-Methode bekannt und setzt die Verwendung der Drapkin-Lösung voraus, die neben Blutlaugensalz auch Kaliumcyanid enthält<sup>67,79</sup>. Sie basiert auf der Umwandlung von Hämoglobin zu Cyanmethämoglobin. Kaliumhexacyanoferrat (III), oder auch rotes Blutlaugensalz genannt, oxidiert dabei das Eisen II in der Hämgruppe zu Eisen III und formt dadurch das Methämoglobin, welches durch Kaliumcyanid zu Cyanmethämoglobin umgesetzt wird und ein Absorptionsmaximum bei 540 nm aufweist. Die Farbintensität, die spektrophotometrisch gemessen werden kann, weist eine Proportionalität zu der Konzentration des gesamten Hämoglobins auf<sup>78,80,81</sup>. Trotz der Nutzung dieser Methode als Referenzmethode für die Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration ist diese Methode nicht auf das SI rückführbar, wie von der Bundesärztekammer und der WHO gefordert wird. Dadurch entspricht diese Methode nicht den metrologischen Standards<sup>5,78</sup>. Zusätzlich erfordert das Arbeiten mit Cyanid wegen seiner Toxizität entsprechende Sicherheitsvorkehrungen und auch eine umweltgerechte Entsorgung. Daher ist ein Bedarf an nicht toxischen Alternativen vorhanden<sup>82</sup>. Neben der HiCN-Methode gibt es noch andere Verfahren wie die AHD-Methode (alkaline Hemin Detergent) und auf der Massenspektrometrie basierende Methoden, welche gegen die HiCN-Methode validiert werden<sup>67,82,83</sup>. Die AHD-Methode stellt einen nicht auf toxischen Materialien basierenden alternativen Ansatz zu der HiCN-Methode dar und basiert auf der Umsetzung von Hämoglobin in alkalisches Hämatin und weitere Bestandteile<sup>82,84</sup>. Der entstandene Farbkomplex weist ein Absorptionsmaximum bei 574 nm auf und kann wie bei der HiCN-Methode photometrisch vermessen werden.

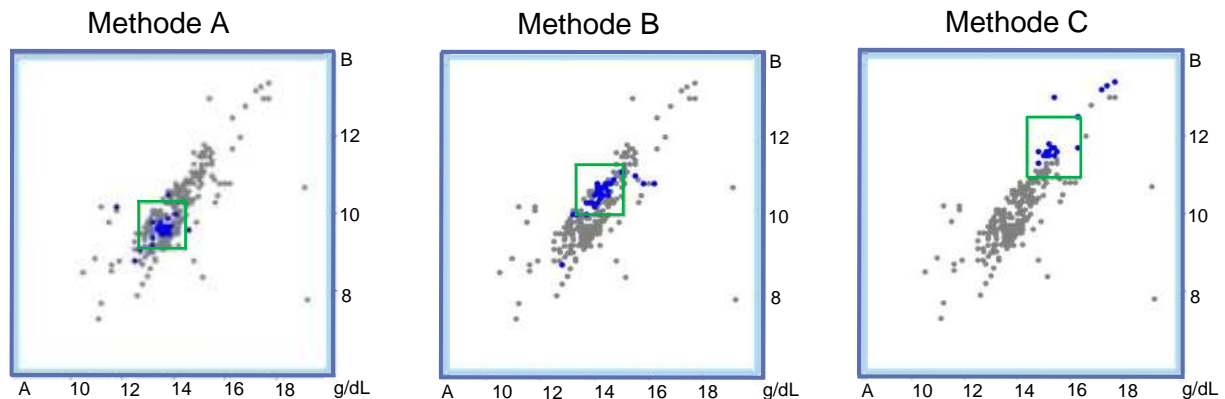
Aufgrund der noch fehlenden Rückführbarkeit der bisherigen Methoden für die Konzentrationsbestimmung ist der Bedarf an einer alternativen Bestimmungsmethode mit nicht toxischen Detergenzien vorhanden, die mit der vorliegenden Methode der ID-SERS realisiert werden könnte.

## **Rückführbarkeit von Messergebnissen in der Labordiagnostik**

Eine Übersicht der am häufigsten gemessenen Laborparameter findet sich in den Richtlinien der Bundesärztekammer mit den jeweils zulässigen Abweichungen der Messergebnisse<sup>5</sup>. Bei der Detektion von Laborparametern können jedoch durch die Verwendung verschiedener Analysemethoden in den Laboratorien unterschiedliche Messwerte erhalten werden. Dies erschwert beispielsweise die Überwachung von Patienten über einen längeren Zeitraum hinweg, bei Langzeit-Screenings oder wenn sie einen Arztwechsel vornehmen<sup>5</sup>.

Das untersuchende Labor kann jeweils eine andere Analysemethode verwenden oder wechselt das verwendete Test-Kit. Jede Analysemethode oder Test-Kit hat dabei eigene Toleranzgrenzen, auch cut-off-Werte genannt, innerhalb derer die Messwerte als richtig oder falsch eingestuft werden. Eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen wird somit erheblich erschwert, da die Werte und die Beurteilung des Gesundheitszustandes eines Patienten unterschiedlich sein können<sup>85</sup>. Eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen bildet somit die Grundlage für die richtige Interpretation von Messungen und daraus resultierend eine optimale Behandlung von Patienten<sup>3,86</sup> und ist damit von besonderer Bedeutung in der klinischen Labordiagnostik, jedoch häufig noch ein zu wenig beachtetes Thema. Referenzmessverfahren ermöglichen das Erreichen einer Vergleichbarkeit sowie das Erzielen und die Bestimmung von Werten mit einer höchsten Richtigkeit sowie Präzision und Genauigkeit. Referenzmessverfahren sowie Referenzmaterialien sind gut charakterisiert<sup>5</sup>. Die genaue Erklärung, die von Eurachem und den Richtlinien der Bundesärztekammer angegeben wird, beschreibt ein Referenzmessverfahren, als ein anerkanntes Messverfahren, welches Messergebnisse erzeugt die geeignet für eine bestimmte Anwendung sind, um die Richtigkeit der Messwerte zu beurteilen<sup>87</sup>. Diese Messwerte werden dabei mit anderen Messmethoden durch Kalibrierung und/oder durch die Verwendung und Charakterisierung der Referenzmaterialien erzielt und beziehen sich immer auf die gleichen Größen wie in dem Referenzmessverfahren<sup>5,87</sup>. Die Messwerte der jeweiligen Analysemethode sollten daher möglichst nahe an denen der Referenzmethode liegen. Ist dies bei einem Analyten nicht gegeben, hängt die Bestimmung der Konzentration häufig von dem messmethodenspezifischen Sollwert ab<sup>5</sup>. Deutlich wird dies bei der Betrachtung von Ringversuchen oder Ringvergleichsmessungen, welche eine externe Qualitätssicherung darstellen und vom Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB) ausgerichtet werden. Dabei untersuchen die Laboratorien die Ringversuchsproben unter ihren jeweiligen Standardbedingungen und übermitteln das Ergebnis an das Referenzinstitut. Liegt das Labor mit seiner Messmethode innerhalb der zulässigen Abweichung, welche in den Richtlinien der Bundesärztekammer angegeben sind, erhält es ein Zertifikat<sup>5</sup>. Teilnehmenden Laboratorien wird so die Möglichkeit einer externen Qualitätskontrolle gegeben<sup>88</sup>. Diese können die Genauigkeit und Qualität ihrer Messmethoden innerhalb der durchgeführten Ringversuche zeigen. Die Darstellung der Ergebnisse von Ringversuchen erfolgt in Youden-Plots, die einen Vergleich der verwendeten Methoden ermöglichen<sup>89</sup>.

Die Auftragung der Ergebnisse in einen Youden-Plot ermöglicht Aussagen über systematische und zufällige Fehler. Die teilnehmenden Laboratorien bekommen dafür zwei Proben A und B von der durchführenden Organisation, dem RfB zugesendet. Mit der jeweiligen Methode wird dann die Konzentrationen der Proben bestimmt und die Ergebnisse an das RfB zurückgesendet. Ein Beispiel für die Auswertung eines solchen Ringversuches für die Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration (OH2/17)<sup>7,90,91</sup> ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8:** Youden-Plots stellen eine Möglichkeit des Vergleiches von Messergebnissen verschiedener Laboratorien dar. Dies wird am Beispiel des Ringversuches für die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration (OH2/17) gezeigt. Die grauen Punkte stellen die Gesamtzahl der Teilnehmer des Ringversuches dar. Die Laboratorien messen die Proben A und B mit ihrer jeweiligen Methode, deren Messwert als blauer Punkt in dem Plot zu sehen ist. Das grüne Rechteck stellt die Bewertungsgrenzen der jeweiligen Methode dar und zeigt, inwiefern die Ergebnisse innerhalb dieser Werte liegen. Abbildung verändert nach Ringversuch OH2/17<sup>6,7</sup>.

Die Youden-Plots enthalten zunächst alle Messwerte der Testmethoden der beteiligten Laboratorien. Der Begriff Methode bezieht sich an dieser Stelle auch auf die Verwendung von Test-Kits. Diese können je nach Hersteller in Bezug auf das Resultat in Qualität und Durchführung voneinander abweichen. Die Ergebnisse der Messungen eines Labors für die jeweilige Testmethode erscheinen als blauer Punkt in dem Plot wie in Abbildung 8 zu sehen ist. Beispielsweise haben von insgesamt 402 teilnehmenden Laboratorien 39 die Proben mit Methode A (Test-Kit A) untersucht. Das grüne Rechteck stellt dabei die erlaubten Bewertungsgrenzen bzw. die jeweiligen zulässigen relativen Abweichungen der Einzelwerte der jeweiligen Methode dar<sup>90</sup>. Ein Vergleich der Messergebnisse der drei dargestellten Methoden zeigt deutlich, dass diese jeweils stark voneinander abweichen. Befinden sich die Messergebnisse in der oberen rechten Ecke des Plots, deuten sie auf zufällige Fehler hin. Liegen die Ergebnisse jedoch nahe der 45° Linie des Plots aber gestreut vor, deutet dies auf einen systematischen Fehler hin. Das durchführende Labor kann eine andere Testmethode verwenden oder diese wechseln, wodurch sich die Messergebnisse im Normbereich befinden können, aber keine Aussage bezüglich früherer Werte getroffen werden kann. Zudem wird deutlich, dass eine exakte Reproduktion der Ergebnisse nicht gegeben ist. Daraus wird ersichtlich, dass es sehr wichtig für eine Beurteilung von Ergebnissen ist, mit höchster Präzision und Genauigkeit vorzugehen, um die Einflüsse, die zu einem abweichenden Ergebnis führen, zu minimieren und wie wichtig die Arbeit mit Referenzmessmethoden ist, um eine Vergleichsmöglichkeit der Messwerte zu erhalten.



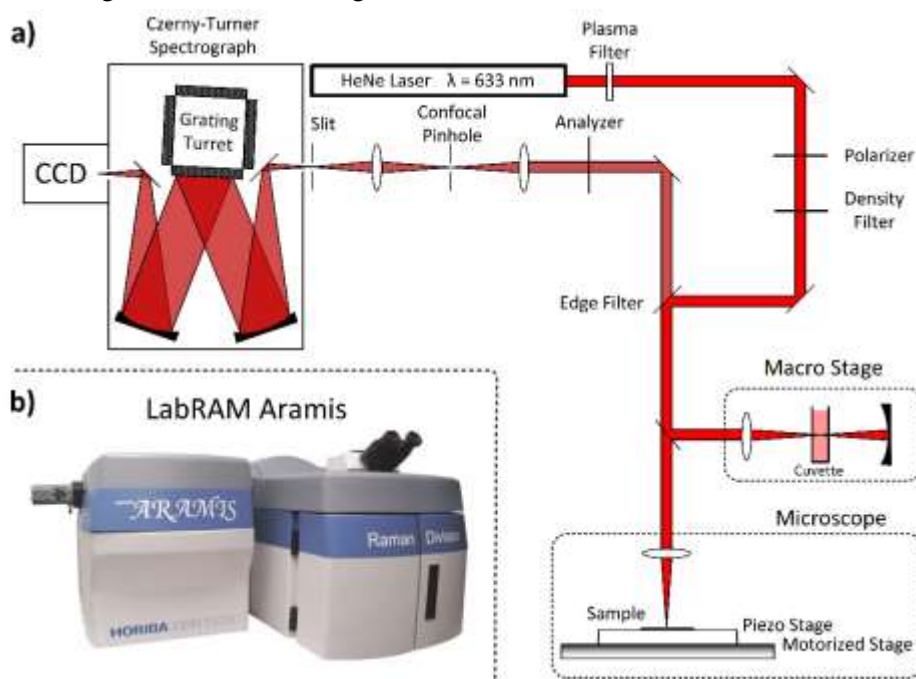
### 3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Geräte, deren Nutzung für die Versuche sowie die Probenvorbereitung und die Messungen dargestellt. Um die Messunsicherheit beim Ansetzen der Proben zu minimieren, wurden diese, wenn nicht anders angegeben, gravimetrisch hergestellt. Bei allen Versuchen wurde, sofern es notwendig war, Reinstwasser ( $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) verwendet. Zur Gewinnung des Reinstwassers aus Leitungswasser, wurde eine Millipore Elix 5 UV kombiniert mit einem Milli-Q Element A10 benutzt. Verwendete Proteine und Geräte sind in den Tabellen 1 und 2 auf Seite 128 dargestellt.

#### 3.1 Raman-Spektroskopie

##### Aufbau des Raman-Spektrometers

Die Raman-Spektroskopie, ist die elementare Methode dieser Arbeit, auf der ein Großteil der Ergebnisse basiert. Sie wird zunächst dargestellt, um einen Überblick über die vorhandenen Messmöglichkeiten zu geben. Die Messungen wurden mit dem LabRAM Aramis von Horiba Jobin-Yvon durchgeführt, dessen Aufbau und die zwei verwendeten Strahlengänge in Abbildung 9 dargestellt sind. Das LabRAM-Aramis besteht aus einer Mikro- und einer Makrokammer. Diese beiden Kammern ermöglichen das Messen der zu untersuchenden Analyten in festem und flüssigem Aggregatzustand. Flüssige Analyten, wie Goldnanopartikellösungen (siehe Abbildung 9a) wurden in eine Glasküvette überführt und in der



**Abbildung 9:** Aufbau des Raman-Spektrometers von LabRam Aramis von Horiba Jobin-Yvon; a) stellt den Strahlengang innerhalb des Spektrometers dar. Durch die Veränderung des Strahlenganges kann entweder in der Makrokammer in Medium oder in der Mikrokammer unter dem Mikroskop gemessen werden; b) Foto der Messapparatur.

Makrokammer mit einem Laser über eine 180°-Retro-Optik angeregt und gemessen. Hierbei wurden Quarzglas-Küvetten der Qualitätsgüte Suprasil (108-QS SD, Hellma Analytics) verwendet, die besonders im visuellen Spektralbereich eine hohe Transmission aufweisen. SERS-Messungen an Goldnanopartikellösungen (mittlere Größenverteilung von  $d=40$  nm) in Quarzglas-Küvetten wurden mit einem HeNe-Laser ( $\lambda=633$  nm) angeregt.

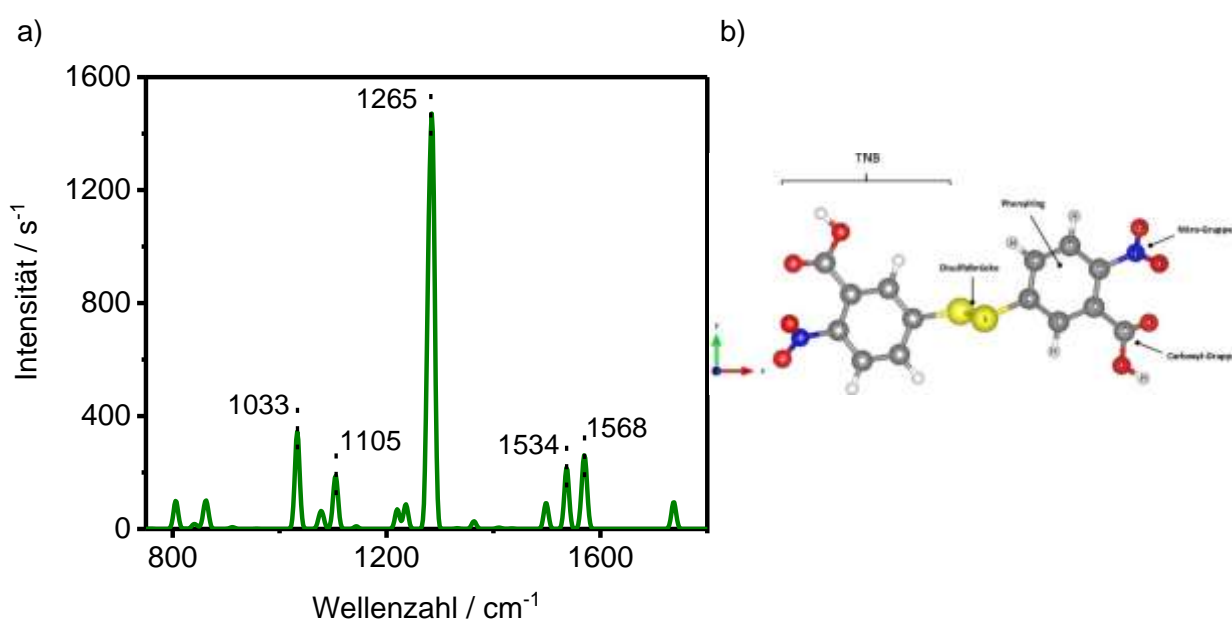
In der Mikrokammer wird prinzipiell in einer 180°-Back-Reflection-Geometry gemessen. Der Laser wird hier über ein Objektiv an einem Olympus BX41 Mikroskop auf die Probe fokussiert und das erzeugte Raman-Streulicht wird über den gleichen optischen Pfad zurückgeleitet. Über eine Reihe von Spiegeloptiken wird das Lichtbündel bestehend aus Rayleigh- und Raman-Streuung zum Czerny-Turner-Spektrographen umgelenkt. Der eingebaute Kantenfilter (Edge Filter) ist vor dem Spektrographen platziert und absorbiert den Großteil der reflektierten Rayleigh-Streuung. Der Stokes-Anteil des Raman-Streulichts wiederum durchläuft den Filter. Innerhalb des Spektrographen wird das Raman-Streulicht über ein spektrales Gitter dispersiv zerlegt und mithilfe einer konkaven Spiegeleinheit mit einer fokalen Länge von ca. 460 mm auf eine Peltier-gekühlte CCD fokussiert. Die CCD detektiert das Streulicht und verarbeitet die gemessenen Lichtquanten zu elektromagnetischen Signalen, dem Raman-Spektrum. Die benötigte spektrale Auflösung kann über die Spaltbreite, des optischen Spalts, eingestellt werden. Für alle Messungen wurde, falls nicht anders angegeben, ein Gitter von 1200 Riefen pro mm verwendet, welches sich für den zu untersuchenden Bereich als eine optimale Größe für die Auflösung der Spektren herausgestellt hatte. Abhängig von der jeweiligen Anwendung wurden die notwendigen Akkumulationen sowie die Belichtungszeit angepasst. Diese sind bei den jeweiligen Versuchen zu finden. Vor den Messungen erfolgte die Kalibrierung des Raman-Spektrometers gemäß der Standard Guide for Raman shift Standards for Spectrometer Calibration<sup>92,93</sup>.

### **3.2 Parameter zur Berechnung und Optimierung der Auswahl eines ramanaktiven Markers**

Wichtig für die Auswahl eines geeigneten Raman-Markermoleküls ist neben dessen Eignung für eine Funktionalisierung auf den AuNP auch dessen Signalintensität und Bandenlage innerhalb der SERS-Spektren. Dies bezieht sich auf den Ramanquerschnitt eines Moleküls, der durch das Vorhandensein von bspw. einer Nitrogruppe begünstigt wird. Eine gute Bindungsfähigkeit auf der Oberfläche der AuNP, etwa durch Thiolgruppen, ist ebenfalls von Vorteil. Das Ziel einer solchen Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Berechnung ist es, die Elektronenstruktur sowie die Wellenfunktionen aller Elektronen an ihren jeweiligen Positionen innerhalb des Moleküls zu kalkulieren<sup>58</sup>. Die Durchführung solch einer Berechnung bezieht sich auf eine geometrische Optimierung, Berechnung der Kraftkonstanten zwischen den Atomen, Berechnung des Polarisierbarkeitstensors und die Berechnung von Polarisierbarkeitsunterschieden durch einen Austausch von Atomen. Diese Vorteile der Methode

wurden dazu genutzt, um mögliche geeignete Raman-Markermoleküle auf deren Eignung für den Immunoassay zu testen. Die Simulationen und Berechnungen erfolgten mittels der Software ORCA<sup>94</sup>.

Die Auswahl eines ramanaktiven Markers erfolgte zunächst durch Berechnungen mit einer Dichtefunktionaltheorie. Es gibt verschiedene ramanaktive Markermoleküle wie 3-Mercaptobenzoessäure, Aniline, Nitrobenzene, Thiophenol und 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoessäure (DTNB)<sup>12,13</sup>, welche in eine engere Auswahl für die DFT-Berechnungen fielen. Zu möglichen Modifikationen zählen der Austausch eines Atoms gegen sein isotopenangereichertes Analogon, Augenmerk wurde dabei auf den Austausch von allen C-Atomen (<sup>13</sup>C<sub>all</sub>), 2 C-Atomen (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>) oder zwei N-Atomen (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>) gelegt. In der folgenden Abbildung 10 ist beispielhaft eine Berechnung solch eines Spektrums von DTNB, dargestellt.



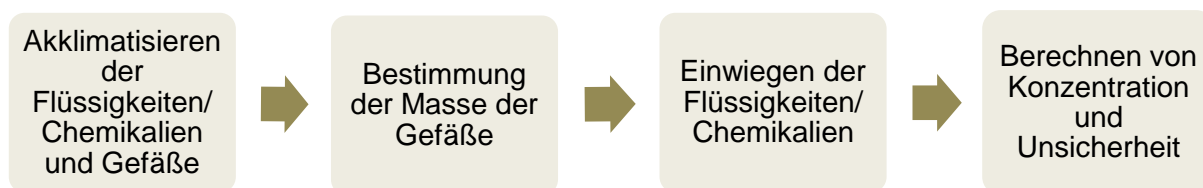
**Abbildung 10:** a) Beispielhafte Darstellung einer DFT-Simulation von DTNB mit den charakteristischen DTNB-Banden bei ca. 1330  $\text{cm}^{-1}$ ; b) zeigt ein DTNB-Molekül.

Aus den DFT-Berechnungen werden prominente Banden des untersuchten Moleküls DTNB sichtbar, bevor dieses in einem realen Ansatz verwendet wird. Daraus können in einem direkten Vergleich mit anderen Molekülen, die durch den Austausch von Atomen modifiziert wurden, Rückschlüsse auf die tatsächliche Eignung für die Raman-Spektroskopie gezogen werden.

Die zu beobachtenden Schwingungen eines Moleküls in der Schwingungsspektroskopie können mit Hilfe  $3N-6$  (und  $3N-5$  für lineare Moleküle) bestimmt werden. Dabei entspricht  $N$  der Anzahl an Atomen im Molekül. Für das in Abbildung 10 dargestellte Beispiel DTNB entspricht dies 48 Schwingungsmoden ( $18 \cdot 3 - 6$ ). Für eine weiterführende Erklärung der mathematischen Hintergründe sei an dieser Stelle auf Literatur<sup>58,95–97</sup> verwiesen.

### Gravimetrisches Ansetzen von Lösungen

Um den Ansprüchen eines metrologisch genauen Arbeitens gerecht zu werden, ist es notwendig, Lösungen gravimetrisch anzusetzen. Dabei handelt es sich besonders um Lösungen die im weiteren Verlauf als Kalibrier- und Referenzlösungen verwendet werden. Dies gewährleistet die exakte Bestimmung der Konzentrationen von Lösungen, was für eine Rückführung von Ergebnissen wichtig ist. So wurden die DTNB-Stammlösungen ebenso wie im Verlauf der Versuche, die Menge an verwendeten AuNP und die Erstellung der Mischungsverhältnisse aus DTNB gravimetrisch angesetzt. Die Herstellung solcher Lösungen verläuft nach dem in Abbildung 11 gezeigten Schema.



**Abbildung 11:** Gravimetrische Herstellung von Stammlösungen. Die Proben sowie die Gefäße müssen zunächst in dem Wägezimmer akklimatisiert werden. Mit Hilfe der Daten ist eine Berechnung der jeweiligen Konzentrationen und Unsicherheiten möglich. Gleichzeitig können die Ansätze so auf einen Verlust an Material bei der Entnahme oder durch Verdunstung überprüft werden.

Die Herstellung der Lösungen erfolgte in einem speziellen, klimatisierten Raum, dem „Wägezimmer“. Die Luftfeuchtigkeit, der Luftdruck und die Temperatur wurden dabei kontinuierlich überprüft und dokumentiert. Da sich die verwendeten Chemikalien und die Gefäße außerhalb dieses Raumes befanden, mussten diese vor Beginn der Herstellung für mindestens 2 h in dem Raum akklimatisieren. Lösungen, die sich zuvor in einem deutlich anderen Klima befanden, müssen länger akklimatisiert werden. Dies diente der Anpassung an den gegebenen Luftdruck, Temperatur und Feuchtigkeit, deren Daten bei jeder Einwaage dokumentiert wurden. Für die Ansätze, die als Stammlösung dienten, wurden PFA (Perfluoralkoxy) Gefäße verwendet, für die kleineren Ansätze Eppendorf® Tubes. Zunächst wurde die benötigte Menge an DTNB und isopenangereichertem DTNB\* eingewogen. Angesetzt wurden jeweils 10 mM Stammlösungen in Ethanol. Die molare Masse von DTNB ist  $396,35 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  und die chemische Reinheit der verwendeten Substanz liegt bei  $\geq 99\%$ . Da das isopenangereicherte DTNB keine handelsübliche Chemikalie ist, wurde es extern von Taros Chemicals GmbH & Co. Kg in einer Auftragssynthese hergestellt. Das synthetisierte DTNB, welches als DTNB\* (oder TNB\* wenn es auf den AuNP funktionalisiert ist) bezeichnet wird, weist eine chemische Reinheit von  $\geq 96\%$  und ein molares Gewicht von  $398,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  auf. Die Reinheit wurde mittels HPLC/MS bestimmt. Für die genaue Bestimmung der eingewogenen Menge an DTNB oder DTNB\* ist es notwendig, ebenfalls das Gewicht der verwendeten Gefäße zu kennen. Bei jeder Messung wurde gewartet, bis sich die Waage auf die fünfte Nachkommastelle eingestellt hatte. Eine beispielhafte Auswertung der Daten zur Erstellung einer Stammlösung ist im Anhang auf Seite 129 Abbildung 51 zu finden. Die Reinheitsdaten sowie das Syntheschema können im Anhang auf Seite 130 Abbildung 52 eingesehen werden. Die

Erstellung solcher Datenblätter ermöglicht eine Überprüfung der Lösungen im Hinblick auf eine Probenentnahme oder Verdunstung und somit - im letzteren Fall - einer Änderung der Konzentrationen der Lösungen.

### **3.3 Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit DTNB/DTNB\*, Antikörper und Hämoglobin**

Die Stärke von Thiol-Gold-Bindungen, stellen eine der Grundlagen für die Ausbildung einer selbst organisierten Monolage (engl. self assembled monolayer, SAM) dar<sup>98</sup>. Bevor die 40 nm AuNP von BBI solutions<sup>99</sup> verwendet werden konnten, wurden diese zweimal bei 2000 g für 15 min zentrifugiert. Die Partikelsuspension weist eine optische Dichte (OD) von 1 auf. Der Citrat-Puffer-Überstand wurde jeweils abgenommen und verworfen. Die überbleibenden AuNP wurden mit (4-(2'-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Puffer, dessen pH-Wert zwischen 7,45 und 7,55 eingestellt wurde, resuspendiert. Der Puffer dient zur Stabilisierung der AuNP-Suspensionen und ist wichtig für eine spätere Funktionalisierung mit organischen Schichten. Die verbleibenden AuNP wurden mit der gleichen Menge an Puffer aufgefüllt, wie abgenommen wurde. Für die Verwendung der AuNP für die Agarose-Gelelektrophorese (siehe Seite 39) wurden die AuNP auf eine OD von 2 konzentriert. Die Funktionalisierung wurde anhand des folgenden Protokolls durchgeführt. Die AuNP wurden separat mit DTNB oder isopenangereichertem DTNB\* versetzt. Pro 100 µL der AuNP-Suspension wurden jeweils 1 µL der jeweiligen 10 mM DTNB/DTNB\*-Stammlösungen verwendet und die Suspension für mindestens 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Menge von 1 µL DTNB und DTNB\* pro 100 µL AuNP, wurde durch Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe festgelegt und hat sich als sinnvoll für die Funktionalisierung herausgestellt. Der Marker wird dabei in einem Überschuss zugegeben. Überschüssiger Marker, der nicht an die AuNP gebunden wurde, wurde durch erneutes Zentrifugieren der Partikel-Suspension abgetrennt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, um die nur schwach pelettierten AuNP nicht mit aufzusaugen, und verworfen. Die AuNP wurden wieder mit HEPES Puffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt, um ungebundenen Marker zu entfernen. Sobald sie AuNP mit DTNB/DTNB\* funktionalisiert sind wird der ramanaktive Marker als TNB/TNB\* bezeichnet.

Anschließend erfolgte die weitere Funktionalisierung der AuNP-TNB/TNB\* mit Antikörper. Die Antikörper wurden durch Adsorption auf den AuNP-TNB/TNB\* gebunden. Dazu wurden 0,9 µL der Stammlösung (1,2 mg/mL) des monoklonalen anti-Hämoglobin-Antikörpers zu jeweils 1 mL AuNP-Suspension (zur Konzentration siehe vorheriger Abschnitt) gegeben und mindestens 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden die AuNP bei 1700 g für 15 min zentrifugiert und mit HEPES Puffer resuspendiert.

Im nächsten Schritt wurden die Partikel mit 0,9 µL Hämoglobin einer 1:1000 Verdünnung der Hämoglobin-Ausgangslösung (mit 130 g/L) für mindestens 2 h inkubiert. Es erfolgte eine erneute

Zentrifugation und Resuspendierung mit HEPES-Puffer. Nach allen Zentrifugationsschritten wurde mittels UV/Vis kontrolliert, ob die funktionalisierten AuNP Anzeichen für eine Aggregation zeigten.

### 3.4 UV/Vis-Spektroskopie

Trifft elektromagnetische Strahlung auf einen Festkörper, können verschiedene Formen der Wechselwirkung auftreten. Im Falle der UV/Vis-Spektroskopie wird die Wechselwirkung von ultravioletter und sichtbarer Licht beim Auftreffen auf Materie betrachtet. Es werden Valenzelektronen angeregt, die dabei von einem bindenden oder nicht-bindenden Orbital in ein antibindendes Orbital übergehen<sup>100</sup>. So können Absorptionsspektren von Molekülen, deren Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten erhalten werden<sup>100,101</sup>. Die UV/Vis-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet, um die AuNP auf ihre Qualität und den Erfolg der Funktionalisierungen zu überprüfen. Die Durchführung der Messungen erfolgte mit dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 1050 von Perkin Elmer. Verwendet wurden Quarzglas Suprasil Halb-Mikro-Küvetten 108-QS SD mit einer Schichtdicke von 10 mm. Diese Küvetten ermöglichen Messungen in einem Wellenlängenbereich von 200 nm – 2500 nm. Die benutzten Quarzküvetten wurden zur Reinigung nach jeder Verwendung mit Königswasser in einem Verhältnis von 3:1 behandelt, um potenzielle in der Küvette noch haftende AuNP aufzulösen und anschließend mit reinem Ethanol gespült, um restliches nicht gebundenes DTNB/DTNB\* zu entfernen. Sofern die Küvetten in Kontakt mit Proteinlösungen kamen, wurden sie zusätzlich mit Miliseptol® gereinigt.

#### **Bestimmung nicht gebundener Antikörper im Überstand der AuNP Lösungen**

Für einen Nachweis der auf der Oberfläche gebundenen Antikörper, wurde ein Easy-Titer™ Mouse IgG Assay Kit von ThermoFisher Scientific, das speziell für den Nachweis von Maus IgG Antikörpern geeignet ist, verwendet<sup>102,103</sup>. Es handelt sich um einen spezifischen Microsphere-Agglutinationstest, bei dem mit polyklonalen Antikörpern auf den zu bestimmenden Antikörper belegte Beads, deren größenbedingtes Absorptionsmaximum bei 340 nm liegt, mit der Messlösung inkubiert werden. Durch Agglutination sinkt die Absorption woraus sich die Menge an zu bestimmendem Antikörper abschätzen lässt. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die an den AuNP gebundenen Antikörper in einem Bereich von 15-300 ng/mL IgG ermöglicht werden. Die Überstände wurden für jede Konzentrationsbestimmung frisch von den jeweiligen Ansätzen abgenommen.

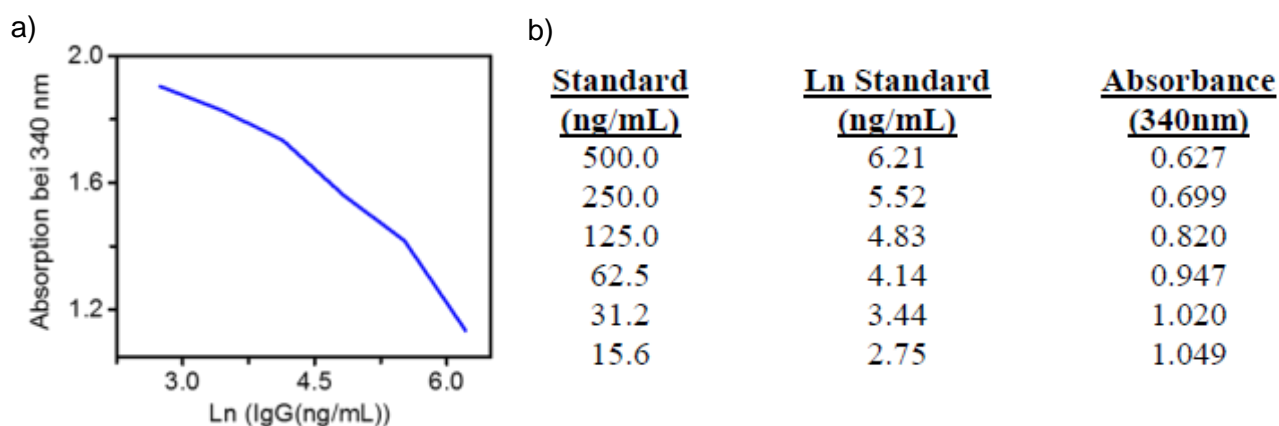
Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten in einem dreifachen Ansatz in 96-Well-Plates von Bio-Rad®. Als Puffer wurde bei allen Ansätzen sowie für die Erstellung der Kalibrierreihe HEPES Puffer verwendet. Für die Proben wurden 20 µL der Antikörper-sensitiven Polystyrol Beads mit 20 µL der Probe, analog mit dem Standard, versetzt und durchmischt. Anschließend wurden 100 µL des zum Test-

Kit gehörenden Blockier-Puffers zu der Mischung gegeben und ebenfalls gut durchmischt. Die Messungen erfolgen bei 340 nm in einem ELISA-Plattenreader von Bio-Rad®. Notwendig für die Berechnung der Konzentrationen ist die Erstellung einer Kalibriergeraden (siehe Abbildung 12a) mit einem IgG-Standard (interner Standard des Kits)<sup>102</sup>. Die Absorption der Proben entspricht in der unten aufgeführten Tabelle (siehe Abbildung 12b) einer Konzentration<sup>102</sup>.

Der jeweils höhere und nächst-niedrigere Wert, die nahe an den Absorptionswerten liegen, werden ausgesucht und in die aufgeführte Gleichung 3.1 eingesetzt<sup>102</sup>. Beispielhaft ist hier eine Rechnung für eine Probe mit einer Absorption von 0,715 die somit zwischen den Konzentrationen 125 und 250 ng/mL liegt, aufgeführt<sup>102</sup>.

Die entsprechenden Werte werden aus der Tabelle übernommen und in die Gleichung eingesetzt. Dies wurde analog, zu diesem Beispiel von ThermoFisher Scientific, mit den bei den Messungen erhaltenen Werten für den jeweiligen Überstand durchgeführt.

$$125 + 125[(0.820 - 0.715)/(0.820 - 0.699)] = 233.5 \text{ ng/mL} \quad (3.1)$$



**Abbildung 12:** a) Kalibriergerade für die Bestimmung der Antikörperkonzentration im Überstand der AuNP Suspensionen nach der Funktionalisierung mit Antikörper; b) Werte für die Berechnung der Konzentration im Überstand. Abbildung verändert nach <sup>102</sup>.

### Funktionalisierungsnachweis mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit einer Mini-Sub Cell GT Cell von Bio-Rad® und diente als eine geeignete Methode für den Nachweis der Funktionalisierung von AuNP<sup>16,27</sup>. Sie ist kostengünstig und einfach durchzuführen. Obwohl die Agarose-Gelelektrophorese in der Biochemie hauptsächlich für die Auftrennung von DNA verwendet wird, kann sie auch für andere Fragestellungen angewandt werden. Die großporige Struktur der verwendeten Gele kann dazu dienen Partikel unterschiedlicher Funktionalisierung zu trennen<sup>104–106</sup>. Verschieden konzentrierte Agarosegele von 0,5% bis 2% wurden getestet und das Gel mit einer Agarosekonzentration von 0,5% zeigte für eine elektrophoretische Auftrennung der AuNP die beste Eignung. Für die Erstellung des Gels wurden 0,3 g Agarose in 60 mL

0,5 x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer mit einem pH-Wert von 8 unter Wärme gelöst und in eine Gelkammer gegossen.

Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5 x TBE verwendet. Um eine möglichst gute Sichtbarkeit der AuNP zu erzielen, wurde die Suspension wie oben erwähnt auf eine optische Dichte von 2 konzentriert. Die Proben der einzelnen Funktionalisierungsschritte (siehe 3.3) wurden aus dem jeweiligen Ansatz entnommen. Pro AuNP-Ansatz, wurden 22,5  $\mu\text{L}$  der Suspensionen abgenommen, die in dem Gel aufgetragen wurden. Damit die AuNP nicht aus den Geltaschen heraus diffundieren, erfolgte die Zugabe von 7,5  $\mu\text{L}$  30%igem Glycerin. Es wurde eine Spannung von 50 V angelegt und das Agarosegel für ca. 2 h laufen gelassen. Das Gel wurde während der Laufzeit durch Eis gekühlt.

### 3.5 Röntgenkleinwinkelstreuung

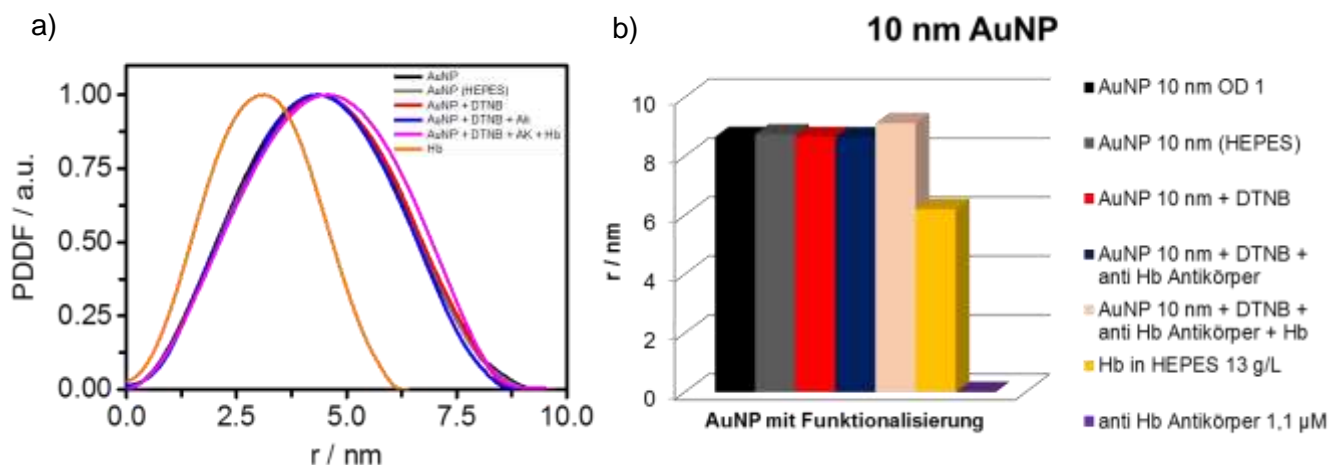
Die Durchführung der Röntgenkleinwinkelstreuung erfolgte zusammen mit dem Institut für Partikeltechnik (iPAT) der Technischen Universität Braunschweig. Die Beschreibung der Röntgenkleinwinkelstreuung (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) erfolgt an dieser Stelle gleichzeitig mit der Darstellung der Ergebnisse, da diese nur eingeschränkte Erkenntnisse für den weiteren Verlauf des SERS-Immunoassays liefern konnten. Bei SAXS handelt es sich um ein Analyseverfahren, dass Messungen der Intensität von Röntgenstrahlen, welche von einer Probe als Funktion des Streuwinkels gestreut werden, ermöglicht<sup>107</sup>. SAXS ist eine etablierte Methode für die Charakterisierung und besonders für die Größenbestimmung von Objekten im Nanometerbereich<sup>108–111</sup>. Die Darstellbarkeit von Proteinen hängt jedoch von einigen weiteren Faktoren wie Größe, Konzentration und Brechungsindex ab, was eine Charakterisierung mit SAXS deutlich erschwert<sup>112</sup>.

Analog zu den anderen in dieser Arbeit verwendeten Methoden sollte die Zunahme des Radius der Partikel in Abhängigkeit der Funktionalisierung nachgewiesen werden. Die Durchführung der Versuche erfolgte mit einem SAXSess mc<sup>2</sup> von Anton Paar. Dazu wurden die AuNP-Suspensionen, Protein- sowie Antikörperlösungen in einer Quarz Durchflussküvette überführt. Die Messungen der Proben erfolgten mit einem Cu- $\alpha$ -Röntgenstrahl (Wellenlänge: 0,154 nm, Spannung: 40 kV, Stromstärke: 50 mA) in einem Vakuum von ca. 2 mbar, welche mittels eines CCD (charged coupled device)-Detektors in ein elektrisches Signal umgewandelt wurden. Die Proben wurden nach den jeweiligen Schritten der AuNP Funktionalisierung den Probengefäßen entnommen und gemessen. Für 40 nm AuNP sowie die mit TNB, Antikörper und Hämoglobin funktionalisierten Partikel konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Größe gemessen werden. Für die nicht funktionalisierten AuNP ergab sich ein Durchmesser von 34,96 nm der sich etwas unterhalb des erwarteten Wertes von 37,0 – 43,0 nm<sup>113</sup> liegt. Eine unterschiedliche Größenverteilung der AuNP in der Ausgangssuspension könnte im Hinblick auf die weitere Funktionalisierung der AuNP eine Bildung von Aggregaten fördern. Dies ist bedingt durch



unterschiedliche Anziehungskräfte der AuNP untereinander, die bereits innerhalb der Suspensionen zu Mikroaggregaten führen könnten. Diese Mikroaggregate begünstigen das Entstehen von größeren Aggregaten. Weitere Messungen der AuNP nach den jeweiligen Funktionalisierungsschritten haben folgende Werte ergeben: AuNP + TNB/TNB\* 34,43 nm, AuNP + TNB/TNB\* + Antikörper 33,94 nm und AuNP + TNB/TNB\* + Antikörper + Hämoglobin 35,88 nm. Die Werte zeigen, dass kein wesentlicher Unterschied bezüglich der AuNP vor und nach den verschiedenen Funktionalisierungen zu sehen ist. Der fehlende Größenunterschied der AuNP zwischen den Messungen kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann dies durch eine zu niedrige OD der Partikel hervorgerufen werden und dadurch als systematischer Fehler in die Messungen eingehen. Ein weiterer kritisch zu betrachtender Faktor ist die Größe der verwendeten AuNP, die eine erhebliche Beeinflussung der Ergebnisse mitbringen kann. Die durch das Gold und die Größe der Partikel verursachte Streuung der auftreffenden Röntgen-Strahlen, führt dazu, dass die auf den AuNP befindlichen biologischen Schichten nicht mehr detektiert werden können.

Somit können organische Schichten aus Antikörper und Hämoglobin auf den Partikeln nicht mehr gemessen werden. Um dennoch einen Nachweis über die Funktionalisierung mittels SAXS zu erzielen, wurden beispielhaft AuNP mit einer Größe von 10 nm in einer Konzentration der OD 1 verwendet. Messungen von Proteinstrukturen können mittels SAXS, je nach dem Brechungsindex der zu untersuchenden Proteine, unterschiedlich sein. Dadurch sind z.B. Metalloproteine einfach darzustellen. Eine Darstellung der Messungen ist in Abbildung 13 zu sehen.



**Abbildung 13:** SAXS-Messungen der Radien funktionalisierter AuNP. a) SAXS Kurvenverläufe von funktionalisierten AuNP. Die 10 nm Partikel weisen einen Radius von 4,3 nm (Durchmesser 8,6 nm) auf; b) Unterschiede zwischen den einzelnen Funktionalisierungen der AuNP sind nur geringfügig zu sehen. Die einzelnen Werte der Radien und Durchmesser können in Tabelle 3 auf Seite 131 entnommen werden.

Der fehlende Größenunterschied der mit TNB/TNB\* sowie Antikörper funktionalisierten AuNP liegt an dem nahezu fehlenden Kontrast, den die Antikörper bieten<sup>107</sup>. Dadurch werden in beiden Fällen lediglich die vorhandenen Partikel gemessen. Strukturen wie Antikörper besitzen einen sehr geringen Brechungsindex und sind dadurch nur schwer optisch nachzuweisen. Die Funktionalisierung mit

Hämoglobin hingegen kann mit einem Unterschied von 0,47 nm zu den nicht funktionalisierten AuNP gemessen werden. Die Messung der konzentrierten Hämoglobin-Lösung zeigt einen Durchmesser von ca. 6,2 nm, der sich mit den Literaturangaben, die von ca. 5 nm für Hämoglobin ausgehen, deckt<sup>110</sup>. Das im Vergleich zu den Antikörpern mit 66 kDa kleinere Hämoglobin hat durch sein gebundenes Eisen einen wesentlich besseren Kontrast als beispielsweise die Antikörper. Insgesamt ließ sich mit den durchgeführten Messungen die Funktionalisierung der AuNP mit organischen Schichten nicht belegen. Jedoch kann angenommen werden, dass das Hämoglobin spezifisch auf den funktionalisierten AuNP durch die Antikörper immobilisiert wurde. Die Bestimmung der Ladungsverhältnisse mit einem Zetasizer<sup>114,115</sup>, waren ebenfalls wenig aufschlussreich. Aus den Messungen von Antikörper- und Hämoglobinlösungen, mit verschiedenen pH-Werten konnten keine weiteren Erkenntnisse über deren Bindungsfähigkeit erzielt werden<sup>116</sup>. Aufgrund der fehlenden Aussagekraft dieser Ergebnisse wurden Messungen mit SAXS und dem Zetasizer für spätere Untersuchungen nicht weiter in Betracht gezogen.

### 3.6 Proteinanalytik

Die Affinität der Antikörper gegenüber dem Hämoglobin wurde mehrmals mit einer klassischen SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), einer nativen PAGE mit anschließendem Western Blot und dem Dot-Blot-Verfahren überprüft. Die Versuche erfolgten mit Hämoglobin von Instand e.V., welches eine Konzentration von 130 g/L aufweist.

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese/ native Gelelektrophorese

Für die SDS-PAGE wurden Gele von Bio-Rad® mit einem Konzentrationsgradienten von 4-15 % verwendet (Mini Protean TGX Stain free gel, Bio-Rad®). Die Gele können sowohl unter denaturierenden als auch nativen Bedingungen verwendet werden. Eingesetzt wurden hierbei als Konzentrationen für die klassische SDS PAGE 3 g/L und 0,3 g/L Hämoglobin. Für den nativen Ansatz wurden 0,3 g/L, 0,03 g/L, 0,015 g/L und 0,003 g/L Hämoglobin eingesetzt. Die Lösungen wurden aus Verdünnungen der der Hämoglobin-Stammlösung (130 g/L) in HEPES-Puffer mit einem pH von 7,5 hergestellt. Es wurden 6 µL Probenpuffer zu den jeweils 20 µL Probe erreicht. Die Ansätze wurden für 5 Min bei 95°C denaturiert. Für den nativen Ansatz wurde nur ein Glycerin basierter Probenpuffer zugegeben, um die Proben zu beschweren. Bei den Gelen der SDS-PAGE wurden 5 µL eines Größenstandards (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad®) zusätzlich aufgetragen. Für die Durchführung eines nativen Ansatzes stand kein geeigneter Standard zur Verfügung und wurde deshalb nicht aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei RT unter der Verwendung von 1x TGS (Tris-Glycin-SDS) Puffer und einer Spannung von 180 V für 40-60 Min. Die Elektrophorese unter nativen Bedingungen erfolgte unter

der Verwendung eines 1x Tris-Glycin Puffers ohne SDS. Die verwendeten stain free Gele ermöglichen eine Überprüfung der Auftrennung bereits vor dem eigentlich durchzuführenden Western Blot, da eine dem Gel zugesetzte Trihalo-Verbindung unter UV-Einwirkung mit den Tryptophan-Seitenketten innerhalb der Proteine zu einer fluoreszierenden Verbindung reagieren und so zu einer kurzzeitigen Fluoreszenz der enthaltenen Proteine führen. Aus diesem Grund wurden die Gele vor jedem Western Blot dahingehend überprüft, ob tatsächlich Proteine in dem Gel vorhanden sind. Die Dokumentation erfolgte mit dem ChemiDoc Touch Imaging System ebenfalls von Bio-Rad®.

### Western Blot

Das SDS-Gel wurde nach dem Lauf mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurde es für 15 min in 1 x Transferpuffer (1x TGS-Puffer) equilibriert. Die für den Blot notwendige Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wurde für 5 min in Methanol aktiviert und erneut mit Reinstwasser gewaschen. Es folgte eine Equilibrierung der Membran zusammen mit dem Filterpapier für 5 min in 1 x Transferpuffer. Anschließend konnte der Western Blot zusammengebaut werden. Nacheinander wurden die Filterpapiere, die Membran und das Gel sowie eine weitere Lage Filterpapier in die Kassette des Blotting-Systems gelegt. Der Turbo Blot erlaubt einen Transfer der Proteine auf die Membran in nur zwei min. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden mit Blockierlösung (1 x TBS Puffer mit 1% Casein und 0,1% Tween20) für 1 h bei RT abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit spezifischen anti-Hämoglobin-Antikörpern, siehe Tabelle 2 Seite 128. Sie wurden in einer Konzentration von 1:7000 für den monoklonalen anti-Hämoglobin-Antikörper (anti-Hemoglobin antibody [11-201.11] von Abcam) und 1:5000 für den polyklonalen anti-Hämoglobin-Antikörper (anti-Hemoglobin antibody, [A80-134A] von Biomol) in Blockierlösung für 1 h bei RT. Um die überschüssigen Antikörperlösungen zu entfernen, wurden die Membranen dreimal mit Tris-buffered saline with Tween20 (TBST) und einmal mit TBS (TBST ohne Tween20) für jeweils 5 min gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären mit Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP)-konjugierten Antikörpern erfolgte ebenfalls bei RT für 1 h in Blockierlösung. Die Verdünnung betrug für beide verwendeten Antikörper jeweils 1:5000. Es erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen der Membranen mit TBST und einmal mit TBS. Die Detektion erfolgte mit dem Clarity Western ECL Substrate von Bio-Rad®, das die Luminol-Chemilumineszenz nutzt und lumineszenz verstärkende Zusätze enthält (ECL = enhanced chemiluminescence). Dieses wurde in gleichem Verhältnis mit je 2 mL auf die Membranen gegeben und für 5 min inkubiert. Die Membranen wurden am ChemiDoc Touch Imaging System von Bio-Rad® mit der optimal auto exposure belichtet.

### Dot Blot

Das Verfahren des Dot-Blot ist eine einfache Technik, die als Routinemethode für den Nachweis eines Proteins in einer Probe angewendet wird<sup>117</sup>. Es erfolgt keine elektrophoretische Auftrennung des Proteins. Für diese Anwendung wurden Verdünnungen der Hämoglobin-Stammlösung (130 g/L) mit Konzentrationen von 1 g/L, 0,1 g/L und 0,01 g/L in HEPES-Puffer mit einem pH von 7,5 hergestellt und mit einem Probenvolumen von 5 µL auf Cellulosenitrat-Membranen von Whatman® mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm getropft. Um ein Verlaufen der Proben auf der Membran zu verhindern, wurden die Proben in zwei Portionen zu je 2,5 µL aufgebracht und 5 min getrocknet. Es folgte ein Blockieren der Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in TBST. Anschließend wurden sie drei Mal in TBST gewaschen. Eine anschließende Inkubation von 1 h mit den primären anti-Hämoglobin-Antikörpern folgte. Dazu wurden der monoklonale anti-Hämoglobin-Antikörper 1:7000 und der polyklonale anti-Hämoglobin-Antikörper 1:5000 verdünnt, die Inkubation erfolgte in 15 mL Reaktionsgefäßen. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 5 min in TBST entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären HRP-konjugierten Antikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei RT mit einer Verdünnung von 1:5000. Es erfolgte ein erneutes Waschen der Membranen. Die Detektion erfolgte mit dem Clarity Western ECL Substrate von Bio-Rad®. Von den ECL Lösungen wurden beide je 2 mL der beiden Komponenten vermischt und für 5 min mit der Membran inkubiert. Die Membranen wurden am Chemidoc Touch System von Bio-Rad® mit der optimal auto exposure belichtet.

## 3.7 Erstellung des Immunoassays: Funktionalisierung von Oberflächen

### Verwendung von Cellulosenitrat-Membranen

Die Erstellung des Immunoassays erfolgte in mehreren Schritten. Dafür wurden die AuNP wie zuvor beschrieben mit TNB/TNB\*, anti-Hämoglobin-Antikörpern und Hämoglobin funktionalisiert. Die Erstellung der für die Isotopenverdünnung notwendigen Mischungsverhältnisse der AuNP mit TNB oder TNB\* erfolgte nach der kompletten Funktionalisierung der AuNP. Bevor diese auf der Membran immobilisiert wurden, wurden wie in Tabelle 4 auf Seite 131 zu sehen 11 verschiedene Mischungsverhältnisse erstellt. Die Erstellung der Mischungen erfolgte aus voneinander unabhängig mit entweder TNB oder TNB\* funktionalisierten AuNP. Zum Zeitpunkt der Erstellung der Mischungsverhältnisse sind diese bereits mit Antikörper und Hämoglobin funktionalisiert. Die für die Immobilisierung dieser AuNP notwendige Funktionalisierung der Cellulosenitrat-Membranen mit einem gegen das gebundene Hämoglobin gerichteten sekundären Antikörper erfolgte in zwei verschiedenen Versuchsansätzen. Für den ersten Versuchsansatz wurden 4 µL des polyklonalen anti-Hämoglobin-Antikörpers mit je 2 x 2 µL (1,0 mg/mL) auf die Membran getropft und trocknen gelassen.

Freie Bindungsstellen außerhalb der Funktionalisierung wurden mit 1%igem Blockiermedium aus Milchpulver, gelöst in HEPES oder TBST, gesättigt. Weitere 1%ige Blockiermedien wurden aus BSA (Bovines Serumalbumin) und RotiBlock® angesetzt. Die Membranen wurden dreimal mit HEPES-Puffer für 5 min gewaschen. Nach der Funktionalisierung der Membranen wurden diese mit den zuvor beschriebenen Mischungsverhältnissen für mindestens 2 h inkubiert. Dabei galt es zu beachten, dass die Membranen vollständig mit der Probenlösung bedeckt waren, weshalb mindestens 500 µL der funktionalisierten AuNP für jede Membran zur Verfügung standen.

Der zweite Versuchsansatz bestand darin, die Membranen vollständig in einer Antikörperlösung mit einem Puffer-Volumen von 150 µL zu inkubieren. Dabei wurden 4 µL des polyklonalen anti-Hämoglobin-Antikörpers in 150 µL HEPES-Puffer gegeben. Ein Blockieren der Membran erfolgte nicht. Im Anschluss wurden die Membranen mit den Mischungsverhältnissen bestehend aus den funktionalisierten AuNP ebenfalls für mindestens 2 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membranen für 5 min mit HEPES-Puffer, um ungebundene Partikel zu entfernen.

Die Membranen wurden im Anschluss daran getrocknet und beide Ansätze in der Mikroammer des LabRam Aramis von Horiba Jobin-Yvon mit einem Laser mit der Wellenlänge 633 nm gemessen. Dabei wurden sowohl Einzelmessungen mit 30 Akkumulationen und 1 s Belichtungszeit als auch ganze Mappings der Membranen durchgeführt. Verwendet wurde ein D 0,6 Graustufenfilter. Für die Einzelmessungen wurde jeweils ein spezifischer Punkt auf der Membran gemessen, wohingegen bei den Mappings ein Areal von 40 x 40 µm mit einer Schrittweite von 1 µm untersucht wurde. Bei den Spektren wurden eine Basislinienkorrektur und Normierung durchgeführt.

### **Herstellung und Messungen von oberflächenfunktionalisierten Glaswafern**

Die Herstellung von oberflächenfunktionalisierten Glaswafern erfolgte mittels silane prep slides von Sigma Aldrich. Diese sind mit einem Aminoalkylsilan funktionalisiert. Die Wafer wurden mit einem Glasschneider so präpariert, dass sie an der Schnittkante in kleinere, möglichst gleichgroße Quadrate gebrochen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bis zur weiteren Nutzung aufbewahrt werden konnten. Dies wurde unter Verwendung von fettfreien Handschuhen durchgeführt, die mittels einer 2%igen Deconnex Lösung, einem Reinigungsmittelkonzentrat und reinem Ethanol hergestellt wurden. Für die weitere Verwendung wurden die Wafer mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) und NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) versetzt. Hierzu wurde jeweils eine EDC-Lösung mit 1,92 mg/mL sowie eine NHS-Lösung mit 1,15 mg/mL angesetzt. Dann wurden 14 µL EDC und 2 µL NHS zu den in 2 mL HEPES-Puffer (pH 7,5) befindlichen Wafern gegeben. (Es wurde hier nicht bedacht, dass die Wafer nicht wie in einem in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich verwendeten Protokoll<sup>118</sup>, Carboxy- sondern Aminogruppen tragen; die Aktivierung der Carboxylatgruppen des

polyklonalen Antikörpers hat also erst bei Zugabe zu den Wafern mit der EDC/NHS-Lösung stattgefunden). Nach 12 min wurden 4  $\mu\text{L}$  des polyklonalen anti-Hämoglobin-Antikörpers zu den Wafern gegeben. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Wafer für je 5 min. Parallel wurden die in verschiedenen Verhältnissen hergestellten Mischungen, bestehend aus AuNP mit TNB und TNB\* + Antikörper + Hämoglobin hergestellt. Die mit TNB/TNB\*, Antikörper und Hämoglobin funktionalisierten AuNP und die vorbereiteten Wafer wurden bei RT über Nacht inkubiert. Es erfolgten erneut drei Waschschrte für je 5 min mit HEPES-Puffer. Die Wafer wurden nach den Waschschrten so getrocknet, dass keine Flüssigkeitsrückstände mehr vorhanden waren. Die Messungen auf den Wafern erfolgten in der Mikrokammer des LabRam Aramis von Horiba Jobin-Yvon mit einem Laser mit der Wellenlänge 633 nm. Es erfolgten bei den Einzelmessungen 10 Akkumulationen mit je 1 s Belichtungszeit. Zudem musste ein D2-Filter eingestellt werden. Es wurden pro Wafer drei Messungen durchgeführt. Zusätzlich wurden ebenfalls Mappings der Oberfläche in einem Bereich von 40  $\mu\text{m}$  x 40  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte über eine Basislinien-Korrektur und eine Flächennormierung. Für eine spätere Erstellung einer Kalibriergeraden in OPUS wurden die Spektren mit Matlab gemittelt und das daraus resultierende Spektrum weiterverwendet. Die Erstellung des Kalibriermodells erfolgte in OPUS. Die statistische Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Modul QUANT2 der Software OPUS von Bruker.

### Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung

Für den Nachweis, dass die oben beschriebene Immobilisierung von Antikörpern auf den silane prep slides von Sigma Aldrich gelingt, wurde eine solche unter vergleichbaren Bedingungen mit einem mit Atto 633 konjugierten sekundären Antikörper (ATTO-TECH GmbH) durchgeführt. Der Ansatz (Wafer + EDC/NHS) wurde durchmischt und mit 4  $\mu\text{L}$  des Antikörpers (1 mg/mL) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation von mindestens 2 h. Danach wurden die Wafer dreimal für 5 min gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Messungen erfolgten in der Mikrokammer des LabRam Aramis mit einer Wellenlänge von 633 nm und einem Objektiv mit 20facher Vergrößerung. Der Filter wurde auf D4 eingestellt. Es erfolgten 3 Akkumulationen mit 1 s Belichtungszeit.

## 3.8 Rasterelektronenmikroskopie

Die Messungen der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung 2.44, Nanostrukturierung und Reinraumzentrum-Infrastruktur der PTB durchgeführt. Für eine Darstellung der Struktur der Membranen und der darauf immobilisierten AuNP eignet sich besonders die REM, bei der die Probe mit Primärelektronen beschossen und das Bild durch die aus der Oberfläche

abgelösten Sekundärelektronen generiert wird. Der fokussierte Elektrodenstrahl rastert dabei die Oberfläche der Probe ab und die zurückgestreuten Elektronen werden von Detektoren aufgenommen. Ein begrenzender Faktor für das Auflösungsvermögen ist dabei die de-Broglie Wellenlänge der Elektronen. Diese kann mit  $\lambda_B = h/\sqrt{2eUm_e}$  dargestellt werden. Abhängigkeiten ergeben sich durch die Beschleunigungsspannung  $U$ ,  $h$  ist das Plancksche Wirkungsquantum,  $e$  die Elementarladung und  $m_e$  repräsentiert die Elektronenmasse. Die Auflösung eines REM wird durch den Abstand zur Probe und die Beschleunigungsspannung bestimmt.

Die Rastergeschwindigkeit eines REMs ist im Vergleich zu anderen Rastermikroskopieverfahren sehr schnell und es können bereits mit einer Bildwiederholrate von 1 Hz sehr gute Bilder aufgenommen werden. Die Tiefenwirkung solcher Aufnahmen hängt zudem von der verwendeten Probenoberfläche ab<sup>37</sup>. Die REM-Aufnahmen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop Typ Supra 40 von Carl Zeiss Microscopy GmbH angefertigt. Aufgenommen wurden die Bilder mit einem Kathodentyp Schottky Field Emission Gun (FEG). Die angelegte Spannung (EHT) beträgt 10 kV. Die weiteren Parameter wie die Vergrößerung wurden probenabhängig angepasst. Die Aufnahme des Signals erfolgte mit InLens Sekundärelektroden-detektor. Die Messungenauigkeit beträgt bei leitenden Proben ca. 1% und der Messfehler mindestens 1 Pixel Size.

### Energiedispersive Röntgenspektroskopie Messungen

Die auf der Membran haftenden AuNP ermöglichten eine elementabhängige energiedispersive Röntgenspektroskopische (EDX) Analyse. Durchgeführt wurde die Analyse mit dem Detektor X-Max 80 mm<sup>2</sup> SDD-Detektor von Oxford Instruments. Die Auswertung erfolgte mit der Analysesoftware AZtec. Die EDX Punktanalyse wurde mit einer Hochspannung von 20 kV, einer WD von 10.0 mm und einer Kippung von 0° durchgeführt. Als Sekundärelektroden-detektor wurde ein SE2 verwendet. Die mögliche Nachweisgrenze bei EDX-Analysen liegt bei leitenden Proben elementabhängig bei 0,1 Gew%. Die EDX Analysen dienen an dieser Stelle hauptsächlich einem qualitativen Nachweis und dem Nachweis von Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und den AuNP.

### 3.9 Reflexionsmessungen

Reflexionsmessungen, die der besseren Charakterisierung der Oberflächen dienen, wurden sowohl mit dem Lambda 1050 von Perkin Elmer als auch mit dem LabRam Aramis von Horiba durchgeführt. Für die Reflexionsmessungen mit dem Lambda 1050, wurde eine Ulbricht-Kugel InGaAs Downward viewing integrating sphere, 150 mm des Lambda 1050 von Perkin Elmer verwendet. Sie ermöglicht das horizontale Messen von Feststoffen wie Membranen in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 2500

nm. Die Kalibrierung erfolgte mit einem labsphere certified reflectance standard. Die Membranen wurden für die Messungen auf einer Halterung befestigt und in einem Wellenlängenbereich von 450 bis 1500 nm und einem Inkrement von 1 gemessen.

### **Differentielle Reflexion mit dem LabRam Aramis Raman Spektrometer**

Die Mikro-Reflexionsmessungen wurden in der Mikrokammer des LabRam Aramis von Horiba Jobin-Yvon durchgeführt. Dazu wurde die Membran mittig geschnitten und hochkant an einem Glasobjektträger befestigt, sodass die Schnittkante der Membran beleuchtet werden konnte. Die Messungen erfolgten in einem Bereich von 400 bis 800 nm (Filter D 6, Gitter 600, Hole 200 µm und Slit 100 µm). Es erfolgten 5 Akkumulationen mit einer Belichtungszeit von 1 s.

Die Berechnung der differentiellen Reflexion, erfolgte durch den Vergleich einer unbehandelten Membran mit einer funktionalisierten. Die Werte wurden mit folgender Formel berechnet.

$$\frac{R - R_0}{R} = \frac{4n}{n_0^2 - 1} \alpha(\lambda) \quad (3.2)$$

### **Rasterkraftmessungen von Goldnanopartikeln auf Glassubstraten**

Für eine detaillierte Messung der Oberflächentopografie von Goldnanopartikeln auf Glassubstraten, wurde das Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope, AFM) des WITec Alpha 300 RA verwendet. Dazu wurde ein kombiniertes AFM-Raman-System von WITec verwendet. Mit diesem Messsystem ist es möglich, neben der Oberfläche von Festkörperstrukturen ebenfalls biologische Materialien zu untersuchen<sup>119–121</sup>. Mappings erfolgten über eine Fläche von 5,0 µm x 5,0 µm im Non-Contact Mode (Resonanzfrequenz ~ 150 kHz) mit einer Schrittweite von 1 nm.

### **3.10 Erstellung einer Messreihe in Kolloid**

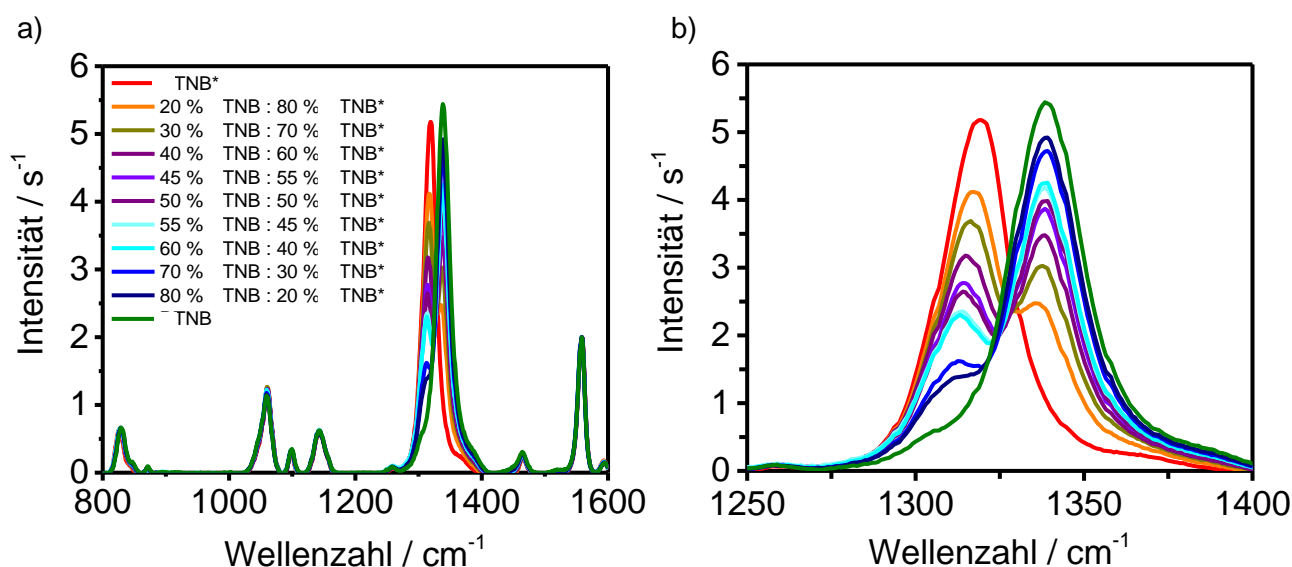
Die SERS-Messungen der AuNP-Suspensionen dienten zunächst dazu, ein vereinfachtes Kalibriermodell, mit vorgemischten Verhältnissen, aus DTNB und DTNB\*, zu erstellen. Dieses ist im Folgenden dargestellt und beispielhaft diskutiert, um eine spätere Auswertung der Ergebnisse des SERS-Immunoassays zu erleichtern. Vorgemischt bedeutet in diesem Fall, dass die DTNB/DTNB\*-Mischungen aus den Stammlösungen (von DTNB und DTNB\*) erstellt wurden. Dann wurden AuNP mit einer bestimmten Menge dieser Mischungsverhältnisse inkubiert ohne die weitere Zugabe von Antikörper oder Hämoglobin. Die Verwendung von vorgemischten Verhältnissen, dient dazu, vorab das



Testformat auf seine Genauigkeit zu überprüfen. Die Mischungsansätze stellen eine Vorlage für die Erstellung und Auswertung der Messungen des SERS-Immunoassays dar. Die Präparation der AuNP erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Standardprotokoll. Für die Messungen in den Küvetten, wurden mindestens 250  $\mu\text{L}$  der AuNP-Suspensionen mit 2,5  $\mu\text{L}$  der DTNB/DTNB\* Mischungen verschiedener Verhältnisse, siehe Tabelle 4 auf Seite 131, für 15 min inkubiert. Überschüssiges bzw. nicht gebundenes TNB/TNB\* wurde durch zweimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren mit HEPES entfernt. Um ein SERS-Signal der funktionalisierten AuNP messen zu können, wurden diese mit 4  $\mu\text{L}$  einer 1 M HCl-Lösung versetzt und ebenfalls für 15 min inkubiert. Innerhalb dieser Zeit ist das Maximum der Signalstärke erreicht, welches nach einer weiteren Inkubationszeit wieder deutlich abnimmt. HCl funktioniert an dieser Stelle als ein Initiator der Anziehung der AuNP, welche für die Messungen in den Suspensionen notwendig ist. Dadurch wird eine Ladung auf den Oberflächen der AuNP erzielt, die zu der Entstehung eines Multipols führt. Die Messungen erfolgten mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm. Jede Messreihe bestand aus 11 Mischungsverhältnissen, mit denen die AuNP funktionalisiert wurden. Die funktionalisierten AuNP wurden dreimal hintereinander gemessen. Um eine ausreichende Anzahl an Messungen zu gewährleisten, wurden drei tagesunabhängige Messreihen angefertigt. Dementsprechend wurden an drei unterschiedlichen Tagen die Lösungen für die jeweiligen Mischungsverhältnisse neu eingewogen. Daraus ergab sich eine Gesamtanzahl von 99 Spektren, die gemessen wurden.

Die Inkubation der AuNP mit den verschiedenen Mischungsverhältnissen erfolgte am jeweiligen Messtag. Dabei ist es essenziell, gleiche Inkubationszeiten und Messzeiten einzuhalten. Dies gewährleistet gleiche Bedingungen während der Probenherstellung und der Messungen. Die Messungen erfolgte in der Makrokammer des LabRam Aramis von Horiba Jobin-Y in Küvetten.

Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 633 nm, 200 Akkumulationen und einer Belichtungszeit von 1 s. Zudem wurden die Spektren mit einer „Minimum-Maximum-Normierung“ auf die Bande bei 1540 – 1600  $\text{cm}^{-1}$  normiert. Diese Bande wurde ausgewählt, da sie sich als sehr konstant herausgestellt hatte. Bei allen gemessenen Spektren wurde eine Grundlinienkorrektur durchgeführt. In die Erstellung des Kalibriermodells floss eine bestimmte Anzahl an Auswahlbereichen der erhaltenen Spektren ein. Die Auswahl fiel auf Bereiche, bei denen die einzelnen charakteristischen Banden von TNB/TNB\* abgebildet werden. Aus Gründen der besseren Darstellung, ist in Abbildung 14 nur eine Messreihe mit 11 Mischungsverhältnissen dargestellt.



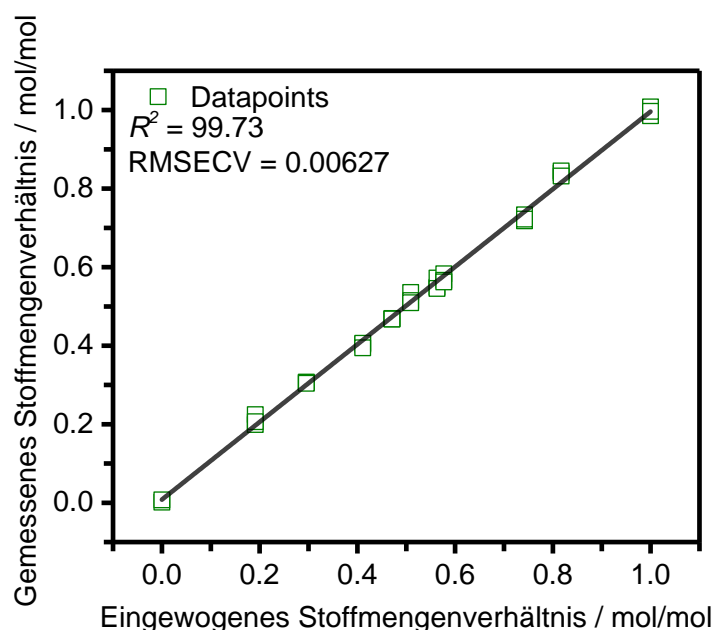
**Abbildung 14:** Kalibriermodell bestehend aus 11 verschiedenen Mischungsverhältnissen aus DTNB und DTNB\*. Abbildung a) zeigt alle Mischungsverhältnisse beginnend von 100 % TNB\* bis zu 0 %. Die Spektren wurden auf die Bande bei 1600  $\text{cm}^{-1}$  normiert und eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Aus Gründen der besseren Übersicht sind nur 11 der insgesamt 99 Spektren dargestellt. Abbildung b) zeigt eine Vergrößerung der für die Auswertung relevanten Banden von TNB und TNB\*. Deutlich sichtbar sind die einzelnen Abstufungen der Intensitäten in Abhängigkeit der Mischungsverhältnisse.

Bei der Betrachtung der Spektren werden die Abstufungen der einzelnen Mischungsverhältnisse deutlich erkennbar. In Abbildung 14a ergibt sich eine gute Übersicht der hergestellten Mischungsverhältnisse, beginnend bei 100% TNB\* bis zu 0% TNB\*. Die Vergrößerung der Spektren in Abbildung 14b verdeutlicht die abnehmenden aber auch gleichzeitig zunehmenden Intensitäten der Banden in Bezug der prozentualen Anteile von TNB und TNB\* in den Mischungsverhältnissen. Anhand der Ansätze können die Mischungsverhältnisse verfolgt werden (Abstufung vom roten zum grünen Spektrum). Die weitere Auswertung der Spektren erfolgte mit einer multivariaten Datenanalyse, in die insgesamt 99 Spektren einfließen.

Die statistische Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Modul OPUS QUANT2 chemometric Software Packet der Firma Bruker Optics<sup>9,68</sup>. Die quantitative Auswertung der Spektren basiert auf einer PLS (partial least square) Regression für eine abhängige Variable. Dabei erfolgt die Validierung über eine interne Kreuzvalidierung (cross validation CV und leave one out validation). Die Prognosefähigkeit

sowie die Anzahl der einzubeziehenden Faktoren in das Modell wurden durch den mittleren quadratischen Fehler (root mean square error, RMSE) beurteilt<sup>68</sup>. RMSE wird nach der Verwendung einer Kreuzvalidierung zu RMSECV (root mean square error of cross validation). Weiterhin wird die Verlässlichkeit des Modells durch den Standard-Vorhersagefehler (standard error of prediction, SEP) abzüglich eines systematischen Fehlers (BIAS) bestimmt.

Allgemein zeichnet sich ein gut funktionierendes multivariates Modell durch einen hohen Korrelationskoeffizienten  $R^2$  und einem geringen RMSECV aus<sup>68</sup>. Die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse sind in Abbildung 15 zu sehen.



**Abbildung 15:** Auswertung des Kalibriermodells mit insgesamt 99 Spektren. Die grünen Quadrate stellen die einzelnen Messpunkte dar, die für jedes der eingewogenen Mischungsverhältnisse stehen. Dabei erfolgt ein Vergleich zwischen den eingewogenen und den gemessenen Stoffmengenverhältnissen.

Die Auswertung aller 99 Spektren hat ein Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 99,73% ergeben und einen Fehler der Kreuzvalidierung RMSECV von 0,00627. PLS-Modelle mit einem  $R^2$  von mehr als 99% gelten als sehr aussagekräftig. Der RMSECV ist mit 0,00627 auch als sehr klein einzustufen. Dieser Wert gibt den Fehler der Kreuzvalidierung an. Das Verfahren der Kreuzvalidierung dient dazu den Vorhersagefehler zu bestimmen. Dazu wurden alle 99 Spektren für die Berechnung des Testformats verwendet<sup>122</sup>. Das kolloidbasierte Testformat zeigt so bereits eine sehr gute Qualität und dient als Vergleichsmöglichkeit für das folgende Testformat auf einer Oberfläche.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

An dieser Stelle werden zunächst die grundlegenden Arbeitsschritte, die notwendig für die Entwicklung des Immunoassays waren, vorgestellt daraus resultierend der Versuchsaufbau des membranbasierten Immunoassays sowie die Ergebnisse. Ein weiterer Ansatz für die Erstellung des Immunoassays auf einer silanisierten Oberfläche wird ebenfalls diskutiert und mit Ergebnissen dargestellt. Zudem erfolgt eine kritische Auseinandersetzung mit der Literatur, da deutliche Diskrepanzen bezüglich der in der Literatur beschriebenen Verfahren und der in den eigenen Arbeiten erhaltenen Ergebnisse.

### 4.1 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB, als ramanaktives

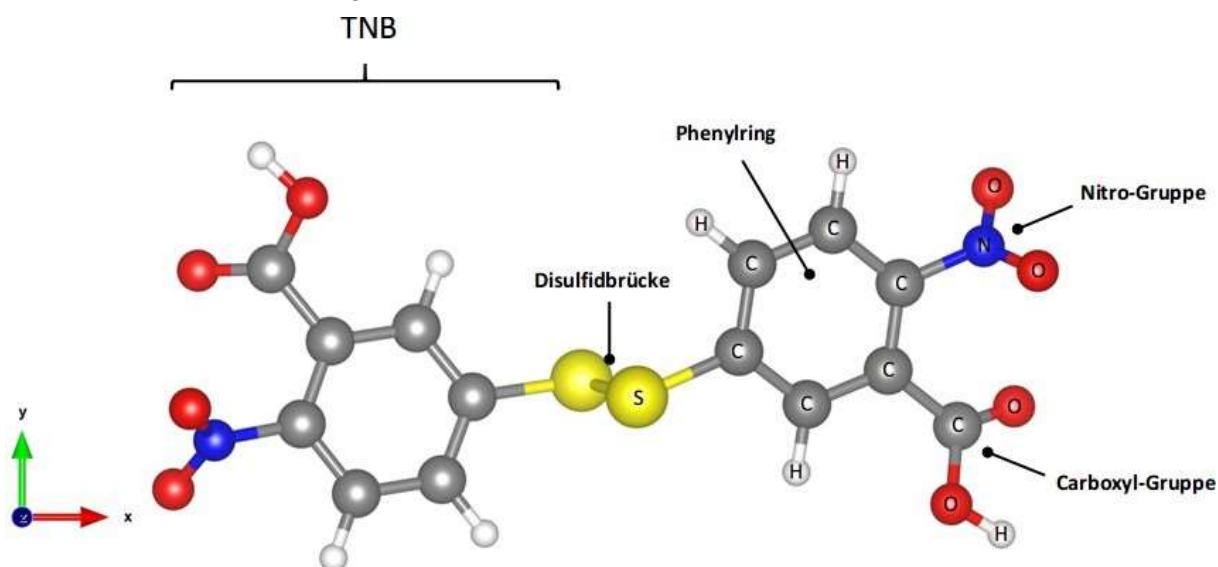
#### Markierungsreagenz

In diesem Kapitel wird DTNB als ramanaktiver Marker untersucht. Die AuNP werden mit DTNB funktionalisiert und dienen so der späteren indirekten Detektion von Hämoglobin.

Ursprünglich wurde DTNB, besser bekannt als Ellman's Reagenz, Ende der 1950er erstmals von George L. Ellman beschrieben<sup>123</sup>. In seiner klassischen Anwendung wird DTNB in der Biochemie benutzt, um die Anzahl an Glutathion- und Thiolgruppen biologischer Proben zu bestimmen<sup>124,125</sup>. Das symmetrische aromatische Disulfid wird durch die Cystein-Thiolgruppen in Proteinen oder Peptiden reduktiv unter Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoat ( $\text{TNB}^-$ ) gespalten, während die andere TNB-Einheit als gemischtes Disulfid an das Protein gebunden wird. Das freigesetzte TNB wird es gelblichen  $\text{TNB}^{2-}$  deprotoniert und zeigt eine Absorption bei 412 nm, die aufgrund der stöchiometrischen Beziehung und der quantitativen Umsetzung zur Quantifizierung von SH-Gruppen genutzt werden kann<sup>124,126,127</sup>. In unserem Fall ist jedoch die oben erwähnte Bindung von DTNB an Goldoberflächen von Interesse und DTNB wird als ein ramanaktiver Marker, der an die AuNP bindet, verwendet.

Ramanaktive Moleküle und spezielle Farbstoffe werden heutzutage aufgrund ihrer spezifischen Schwingungsspektren<sup>12,13</sup> bei einer Vielzahl verschiedener SERS-Anwendungen benutzt. Die meisten der verwendeten ramanaktiven Reagenzien bestehen aus Mercaptobenzoessäure und Derivaten dieser. TNB, BMBA (2-Bromo-4-mercaptobenzoessäure) und MBA (4-Mercaptobenzoessäure) wurden in der Literatur bereits als ramanaktive Marker beschrieben und scheinen besonders für Anwendungen mit SERS geeignet zu sein<sup>12,13</sup>. Diesen Markern ist gemein, dass sie leicht eine selbstorganisierte Monolage auf metallischen Oberflächen ausbilden und prominente Banden in den SERS-Spektren aufweisen<sup>12,13</sup>. Besonders DTNB (TNB) hat sich in der Literatur bereits als ein sehr geeigneter ramanaktiver Marker bei der indirekten Detektion von Biomarkern wie z.B. Staphylococcus-Enterotoxin oder Tau-Protein<sup>128,129</sup> bewährt. Die starke Chemisorption von DTNB an Gold- und Silber-Nanopartikeln

ermöglicht schließlich eine indirekte Detektion des über TNB-gekoppelte Antikörper gebundene interessierende biologischen Zielmoleküls, unabhängig von dessen Größe und Beschaffenheit, bis hin zu der gleichzeitigen Detektion mehrerer Analyten, dem multiplexing, sofern diese eine Antikörper-Antigen-Reaktion eingehen<sup>13</sup>. Aufgrund der Vielzahl an positiven Eigenschaften des DTNB im Hinblick auf die Verwendung innerhalb des SERS-Immunoassays, wurde es für unsere Arbeit ausgewählt. Für die angestrebte Konzentrationsbestimmung des Analyten wird der Ansatz der ID umgesetzt. Dieser benötigt neben dem Marker in nativer Form eine isotopenangereicherte Form des DTNB, das DTNB\*. Neben der sehr guten Bindung von DTNB an die AuNP ist eine weitere ausschlaggebendere Eigenschaft des Markierungsreagenz wichtig für die Verwendung in der ID. Dies ist sein schwingungsspektroskopisches Verhalten, welches besonders deutlich wird, bei der Betrachtung der DTNB-Struktur in Abbildung 16.

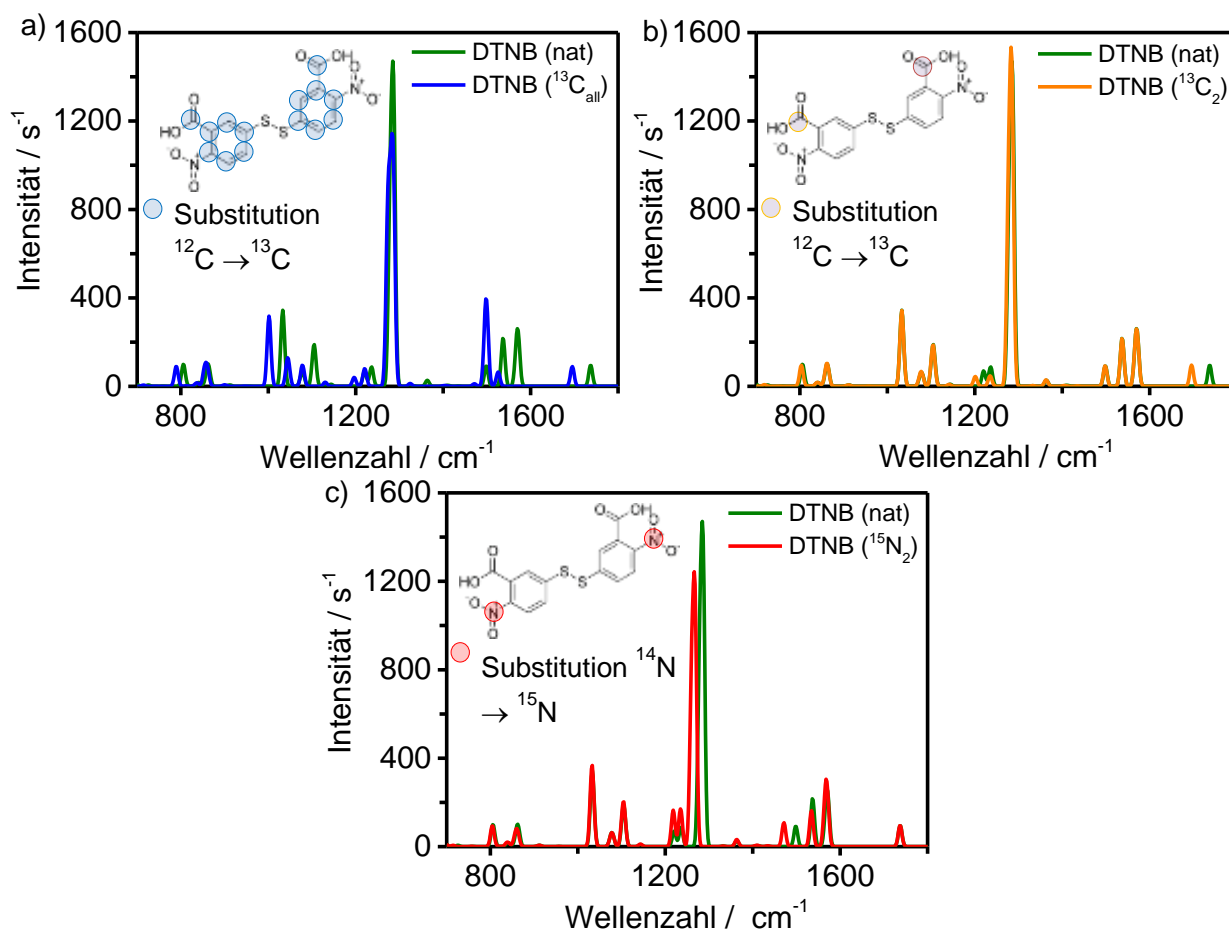


**Abbildung 16:** DTNB zeichnet sich besonders durch die an den aromatischen Ring (dunkelgrau) gebundenen Nitrogruppen (blau) aus. Verbunden sind die zwei aromatischen Ringe über eine Disulfidbrücke (gelb). Rot dargestellt sind Sauerstoffatome..

DTNB bzw. TNB zeichnet sich besonders durch die Nitrogruppe aus, die an den aromatischen Ring gebunden ist. Diese Nitrogruppe weist einen sehr großen Raman-Streuquerschnitt auf. In den Raman-Spektren können die Streckschwingungen der Nitrogruppe als sehr prominente Banden mit großen Intensitäten gemessen werden. Diese beschriebenen Eigenschaften wurden, bevor das DTNB experimentell verwendet wurde, durch Simulationen getestet. Dies ist zudem wichtig für die Auswahl eines Isotopologs für die Umsetzung der ID und wird im Folgenden genauer diskutiert.

## Simulation der Schwingungsspektren von DTNB und isotonenangereichertem DTNB

Für die Durchführung einer ID ist es notwendig den ramanaktiven Marker neben der nativen Form in einer isotonenangereicherten Form vorliegen zu haben. Durch das etwas größere Gewicht des Isotopologs im Vergleich zu der nativen Form des DTNB entsteht ein Raman-shift in Richtung der kleineren Wellenzahl. Die dadurch entstehende Verschiebung ermöglicht in Kombination mit der ID die Bestimmung der Analytkonzentration<sup>9,62,63,68</sup>. Bei der Auswahl eines geeigneten isotonenangereicherten Analogons sind vorab durchgeführte Simulationen sinnvoll, welche eine Abschätzung des tatsächlichen Nutzens des Markers für die SERS-Messungen ermöglichen. Der Einfluss der jeweiligen Substitutionen, auf die resultierende Verschiebung in den Raman-Spektren, wird so deutlich. Eine Voraussetzung für ein geeignetes Isotopolog ist eine Verschiebung von mindestens einer Bande des Spektrums um mehrere Wellenzahlen. Als mögliche isotonenangereicherte Analoga kamen Varianten bei denen Kohlenstoffatome von  $^{12}\text{C}$  gegen  $^{13}\text{C}$  und Stickstoff gegen sein Isotopolog  $^{15}\text{N}_2$  ausgetauscht wurde in Frage. Insgesamt wurden drei Simulationen eines isotonenangereicherten DTNB durchgeführt, die in Abbildung 17 zu sehen sind.



**Abbildung 17:** Simulationen der SERS-Spektren von DTNB (nat), (a) DTNB  $^{13}\text{C}_{\text{all}}$ , (b)  $^{13}\text{C}_2$  und (c)  $^{15}\text{N}_2$ . Charakteristisch für DTNB sind die Banden bei ca.  $1330\text{ cm}^{-1}$ , die bei allen Isotopenangereicherten Varianten zu sehen sind. Eine deutliche Verschiebung dieser Bande tritt nur bei der Substitution von  $^{14}\text{N}_2$  gegen  $^{15}\text{N}_2$  auf. Weitere Verschiebungen sind bei  $^{13}\text{C}_{\text{all}}$  und  $^{13}\text{C}_2$  in den Bereichen von  $1000\text{ cm}^{-1} - 1100\text{ cm}^{-1}$  und  $1500\text{ cm}^{-1} - 1600\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen.

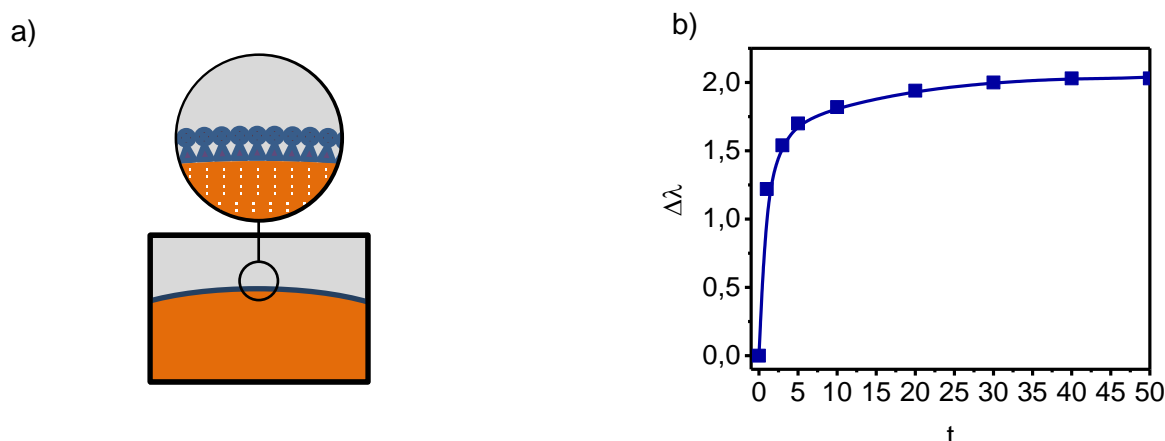
Dem Vergleich der Simulationen der SERS-Spektren von DTNB und den isotonenangereicherten Analoga ist zu entnehmen, dass es bei allen drei Varianten zu einer Verschiebung der Spektren zu der kleineren Wellenzahl kommt. Diese Verschiebung fällt unterschiedlich stark aus. Bei allen simulierten Spektren tritt deutlich die Bande der Nitrogruppe bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  hervor. Verschoben ist diese jedoch nur bei dem Isotopolog  $^{15}\text{N}_2$ , da die Substitution mit  $^{15}\text{N}_2$  direkten Einfluss auf die Streckenschwingungen der Nitrogruppe hat. Die aromatischen Ringverbindungen werden durch diese Substitution geringer beeinflusst, was in einer geringer ausfallenden Verschiebung resultiert. Bei der Betrachtung der Varianten mit der  $^{13}\text{C}$ -Substitution fällt auf, dass der Austausch von  $^{13}\text{C}_2$  nur zu einer geringen Verschiebung der Banden bei ca.  $1700\text{ cm}^{-1}$  und  $1220\text{ cm}^{-1}$  führt. Die Substitution von  $^{13}\text{C}_{\text{all}}$  führt zusätzlich zu einer Verschiebung der Raman-Banden bei ca.  $1050\text{ cm}^{-1}$  bis  $1100\text{ cm}^{-1}$  und bei ca.  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Aufgrund der resultierenden Raman-Verschiebung der Spektren kamen sowohl die isotonenangereicherte Variante  $^{13}\text{C}_{\text{all}}$  als auch  $^{15}\text{N}_2$ -DTNB in die engere Betrachtung für eine weitere Verwendung innerhalb des SERS-Immunoassays. Da die Synthesen nicht vor Ort durchgeführt werden konnten, musste das isotonenangereicherte DTNB extern hergestellt werden. Die Synthese von  $^{13}\text{C}_{\text{all}}$  DTNB stellte sich als sehr aufwendig und wesentlich teurer heraus als die des  $^{15}\text{N}_2$ -Isotopologs. Ein weiterer Vorteil, den die  $^{15}\text{N}_2$ -Variante bietet, ist die sehr deutliche Verschiebung der für TNB so charakteristischen Nitrogruppe bei  $1330\text{ cm}^{-1}$ , die eines der Auswahlkriterien für die Verwendung von TNB als ramanaktivem Marker war. Letztendlich wurde sich für eine Synthese von  $^{15}\text{N}_2$ -DTNB, das Isotopolog mit der Substitution von  $^{14}\text{N}_2$  gegen  $^{15}\text{N}_2$ , entschieden. Die Herstellung von  $^{15}\text{N}_2$ -DTNB wurde als Auftragssynthese von Taros Chemicals GmbH & Co. KG durchgeführt. Die Reinheit des synthetisierten  $^{15}\text{N}_2$ -DTNB beträgt, laut Herstellerangaben 96% und wurde mittels uHPLC/MS überprüft. Ein Syntheschema mit weiteren Angaben zur Herstellung und Reinheitsbestimmung sind im Anhang auf Seite 130 Abbildung 52 zu finden. Für die weitere Verwendung von DTNB\* musste jedoch noch getestet werden, ob sich die realen Spektren mit den Ergebnissen der Simulationen decken. Die zuvor durchgeführten Simulationen und Überlegungen sind bisher nur ein theoretisches Modell, das als Ausgangspunkt für die experimentelle Überprüfung dient. Aus Gründen der Vereinfachung wird im Weiteren  $^{15}\text{N}_2$ DTNB als DTNB\* und nach der Funktionalisierung auf den AuNP als TNB\* bzw. DTNB als TNB bezeichnet.

## 4.2 Oberflächenfunktionalisierung der AuNP mit DTNB/DTNB\*

Die Funktionalisierung von Goldoberflächen mit Thiolen und Thiol-Verbindungen zählt zu den verbreiteten Methoden für die Ausbildung einer molekularen Monolagenschicht (self assembled monolayer, SAM) auf metallischen Oberflächen<sup>130</sup>. SAMs entstehen durch einen selbstorganisierten Anlagerungsprozess (Chemi/Physisorption) von Molekülen auf einer Substratoberfläche. Unter gewissen thermodynamischen Bedingungen mit Bezug auf die Entropie kommt es zur sterischen Ausrichtung der Moleküle untereinander auf der Substratoberfläche, die eine größtmögliche Packungsdichte ermöglicht. Bei der Ausbildung von SAMs mithilfe von Thiolen auf Goldoberflächen bilden sich chemische Bindungen zwischen Gold und Schwefel (Au-S) aus. Die Bindungsstärke von Au-S ist deutlich größer als die chemische Bindung zwischen den Goldatomen untereinander<sup>12,13,98</sup>. Diese hohe Bindungsstärke von Au-S ist für die Funktionalisierung der AuNP mit TNB/TNB\* vorteilhaft. Andere Moleküle oder Verunreinigungen, die lediglich physisorbiert sind, werden durch den energetisch günstigeren Chemisorptionsprozess von Thiolen verdrängt. Chemisorbierte Thiole bilden durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Anteilen der Thiolmoleküle stabile und geordnete SAMs mit einer Bindungsstärke von >150 kJ/mol aus<sup>131</sup>. Das spektrale Absorptionsmaximum von Goldnanopartikeln ist von deren Größe maßgeblich abhängig. Die Anlagerung von weiteren Liganden (TNB/TNB\*, Hämoglobin bzw. Antikörper) durch Physi- oder Chemisorption verändert das dielektrische Verhalten der Nanopartikel und führt zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums im UV/Vis und ist deshalb ein nützliches Werkzeug, um die einzelnen Anlagerungsprozesse von TNB/TNB\*, Hämoglobin und Antikörper zu charakterisieren. Die Charakterisierung erfolgt durch ein Monitoring der spektralen Verschiebung der jeweiligen Absorptionsmaxima. Des Weiteren können Rückschlüsse auf Aggregationsprozesse der AuNP gezogen werden, wenn sich instabile Nanopartikellösungen bei den einzelnen Funktionalisierungsschritten des Immunoassays in den Lösungen der Goldpartikel bilden. Für einen Aggregationsprozess typische Spektralbanden befinden sich in diesem Fall in einem Bereich von 700 bis 800 nm.

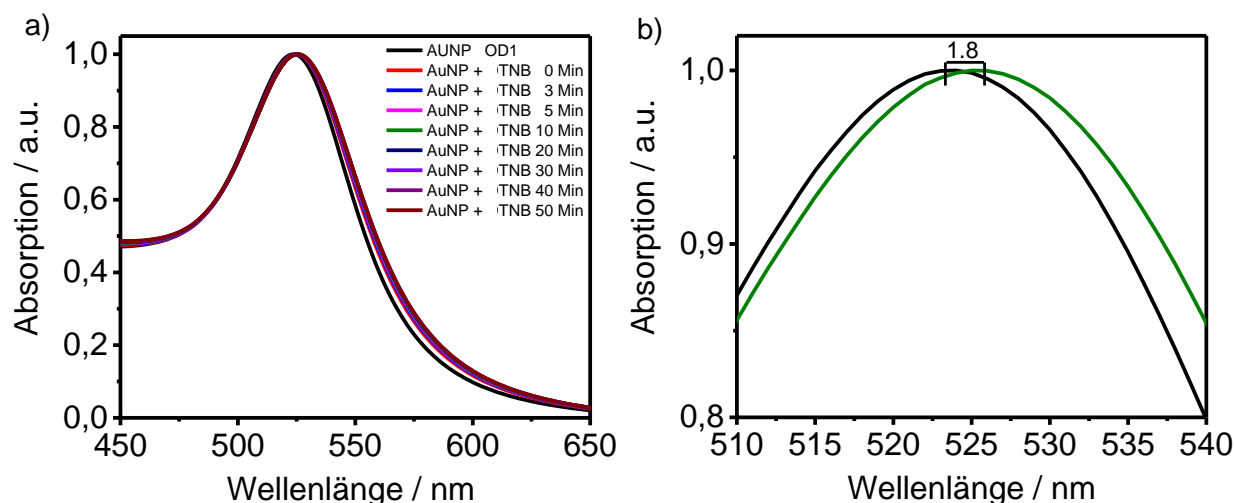
Bei der Chemisorption von TNB-Molekülen auf Goldoberflächen kommt es zur reduktiven Spaltung des Disulfids, so dass schließlich zwei TNB Moleküle an den Oberflächenatomen der AuNP binden. Abbildung 18a verdeutlicht schematisch die Ausbildung einer SAM aus Molekülen auf metallischen Nanopartikeln. Die Moleküle bilden eine geordnete Schicht auf den metallischen Nanopartikeln. Weiterhin können bei der Betrachtung von Messungen der Beladung der Partikeloberflächen, mit einer UV/Vis-Analyse, Aussagen über die Schnelligkeit des Prozesses gemacht werden (siehe Abbildung 18b).





**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Ausbildung einer SAM mit einem zeitlichen Verlauf der Bindung auf den AuNP. Abbildung a) zeigt ein metallisches Nanopartikel mit einer SAM eines ramanaktiven Markers; b) Zeitabhängigkeit der Adsorption von TNB auf den AuNP. In den ersten Minuten der Inkubation findet die Anlagerung des Großteils der Moleküle statt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit ist nur noch ein leichter Anstieg der Verschiebung zu messen.

Rund 80% der Moleküle einer SAM werden innerhalb weniger Sekunden auf der Oberfläche chemisorbiert wie von Küstner beschrieben<sup>131</sup>. Daraufgehend werden immer mehr Moleküle auf der Oberfläche gebunden, bis eine maximale Packungsdichte vorhanden ist. Durch Entstehung einer SAM kann nicht nur die Adsorption störender Moleküle vermindert werden sondern es kann auch eine Stabilisierung der Partikel erfolgen<sup>12,13,131</sup>. Um eine optimale Packungsdichte auf der Oberfläche der AuNP zu erzielen, wurde die Menge an DTNB deutlich im Überschuss zu den AuNP gegeben. Dabei wird berücksichtigt, dass pro DTNB zwei TNB Moleküle entstehen, mit denen die Partikeloberfläche bedeckt wird. Resultierend aus der Funktionalisierung der AuNP mit TNB bzw. TNB\* können Veränderungen des Brechungsindex beobachtet werden. Die Veränderungen der AuNP durch die Funktionalisierung wurden in unterschiedlichen zeitlichen Abständen gemessen. Dies sollte bei der Festlegung einer geeigneten Inkubationszeit der AuNP mit TNB helfen. Die AuNP wurden dazu in zeitlichen Abständen von 3 min, 5 min, 10 min und dann jeweils nach weiteren 10 min bis zu 50 min im Vergleich zu nicht funktionalisierten AuNP gemessen. Durch die Funktionalisierung mit TNB erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um  $\Delta\lambda \sim 1,8$  nm von  $\lambda \sim 523$  nm für die ursprünglichen Partikel zu  $\lambda \sim 525$  nm. Dies wird in der folgenden Abbildung 19 verdeutlicht.

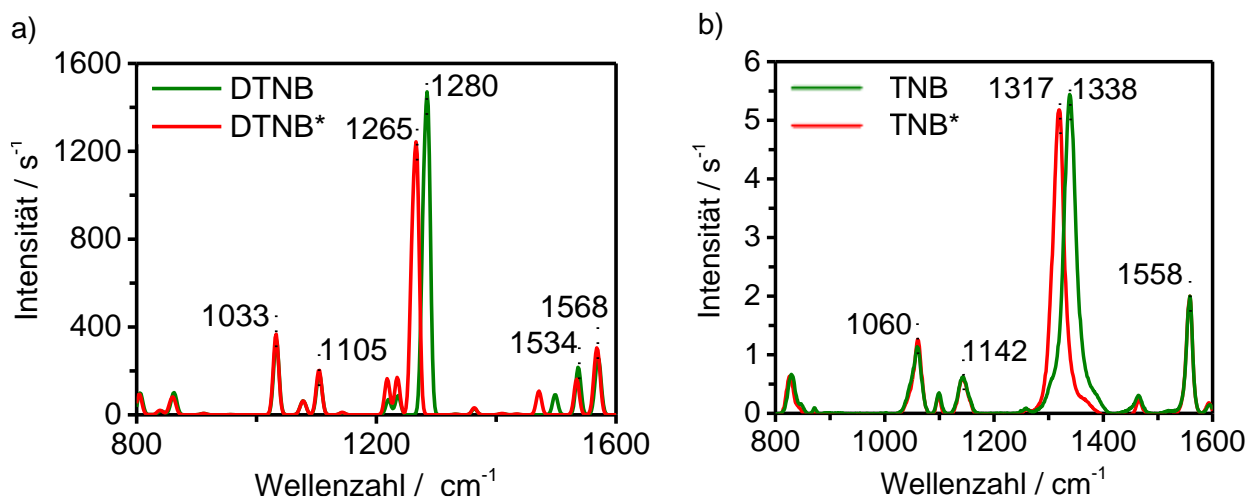


**Abbildung 19:** Darstellung der Verschiebung des Absorptionsmaximums bei der Ausbildung einer SAM aus TNB. Abbildung a) zeigt die verschiedenen Inkubationspunkte während der Messungen mit UV/Vis. Abbildung b) zeigt die Verschiebung von 1,8 nm die nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bestimmt wurde. Die Spektren wurden für eine bessere Vergleichbarkeit der Banden auf 1 normiert.

Aus den Ergebnissen der Messungen, die in den Abbildungen 18b und 19 dargestellt sind, wird deutlich, dass sich die SAM im Wesentlichen innerhalb der ersten Minuten bildet. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten erfolgt nur eine sehr geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums, was darauf hindeutet, dass die maximale Belegungsdichte der Partikeloberfläche nahezu erreicht ist. Da durch eine längere Inkubationszeit der AuNP mit dem TNB nicht mit einer dichteren Beladung der SAM zu rechnen ist, wurde für die Inkubation die Zeit von 15 Minuten als Standard festgelegt. Bei der Betrachtung der Abbildung 19b fällt weiterhin auf, dass die Beladungskurve eine Langmuir-Isotherme zeigt<sup>132</sup>. Bei einer Langmuir-Isotherme geht man von der Annahme aus, dass die aktiven Stellen auf der Oberfläche durch eine monomolekulare Schicht, in diesem Fall aus den TNB Molekülen, besetzt werden und eine vollständige und gleichmäßige Adsorption des Sorbats auf der Oberfläche erfolgt. Die adsorbierten Teilchen stehen in keiner Konkurrenz miteinander um die Adsorptionsplätze auf der Oberfläche der AuNP und können sich daher besonders gut in einer Monolage auf den AuNP anordnen<sup>132–134</sup>. Eine Aggregation der AuNP konnte vor Beginn der Funktionalisierung oder auch danach mittels UV/Vis nicht festgestellt werden.

### Vergleich der DFT Simulationen mit Messungen in Kolloid

Nach der in Auftrag gegebenen Synthese von DTNB\* war es nun möglich, reale Messungen in Kolloid durchzuführen und diese mit den Simulationen zu vergleichen. Für die Messungen in Kolloid (AuNP von BBI solutions) konnte durch Vorversuche bestimmt werden, bei welcher Modifikation von DTNB (siehe Abbildung 17) eine geeignete Bandenverschiebung auftritt, die für die ID genutzt werden kann. Da die vorangegangenen Simulationen frei von Einflussfaktoren wie Pufferlösung, pH-Wert und weiteren Matrix-Einflüssen durchgeführt wurden, können sich die Messungen in Kolloid (in Puffer befindliche AuNP) durchaus unterscheiden. Weiterhin zeigt sich durch den Vergleich auch, wie gut eine softwarebasierte Simulation als Vorhersagemodell für das schwingungsspektroskopische Verhalten eines ramanaktiven Markers verwendet werden kann. Die aus den realen Messungen erhaltenen Spektren von mit TNB und TNB\* funktionalisierten AuNP sind in Abbildung 20 dargestellt und werden mit denen der Simulation verglichen. Die Spektren zeigen sowohl bei der Simulation als auch bei den Messungen die erwartete Verschiebung der Banden in Richtung der kleineren Wellenzahlen.



**Abbildung 20:** Vergleich der Simulationen von DTNB und DTNB\* mit realen Messungen. Abbildung a) zeigt die Simulationen von DTNB und DTNB\*; b) zeigt SERS-Spektren von mit TNB und TNB\* funktionalisierten AuNP.

Die Verschiebung der charakteristischen DTNB-Bande der Simulation von 1280 cm<sup>-1</sup> zu 1265 cm<sup>-1</sup> beträgt 15 Wellenzahlen und bei den Messungen in Kolloid, die nun aufgrund der Bindung von TNB/TNB\* an die AuNP zu 1338 cm<sup>-1</sup> zu 1317 cm<sup>-1</sup> um 21 Wellenzahlen verschoben sind. Diese Bande ist auf eine starke symmetrische Streckschwingung der Nitrogruppe zurückzuführen. Das höhere molekulare Gewicht des isotonenangereicherten DTNB führt zu einer langsameren Schwingung der betroffenen Nitrogruppe, was in einer zur kleineren Wellenzahl verschobenen Bande resultiert. Weiterhin sind die Banden im Bereich von 1033 cm<sup>-1</sup> bis 1142 cm<sup>-1</sup> und 1534 bis 1558 cm<sup>-1</sup> zu sehen, die den aromatischen Ringschwingungen des Benzolrings zugeordnet werden können. Diese werden wenig durch die N-Markierung beeinflusst, was an dieser Stelle zu einer kleineren Verschiebung führt. Der Vergleich zwischen Simulation und den Messungen in Kolloid zeigt, dass sich die

simulationsbasierte Vorhersage der resultierenden Schwingungen in realen Messungen wiederfinden lässt.

### 4.3 Proteinanalyse mit Gelelektrophoreseverfahren

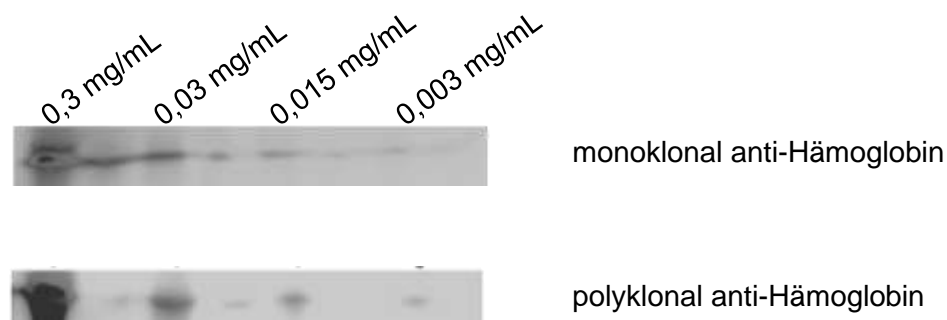
In diesem Kapitel wird die Antikörper-Antigen-Reaktion im Hinblick auf die Eignung für den SERS-Immunoassay getestet. Dies sollte zeigen, ob die ausgewählten Antikörper für die Verwendung innerhalb des SERS-Immunoassays geeignet sind. Die Eignung der Antikörper bezieht sich dabei besonders auf deren Bindungsfähigkeit gegenüber Hämoglobin.

Die Leistungsfähigkeit biochemischer Testformate, die auf der Interaktion von Antikörpern und Antigenen beruhen, ist hauptsächlich durch die Spezifität der verwendeten Antikörper gegenüber dem Antigen bestimmt<sup>16</sup>. Spezifität bezieht sich dabei auf die Fähigkeit des Antikörpers, - in unserem Fall das Hämoglobin - spezifisch und auch in Gegenwart anderer Komponenten zu binden. Die verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper gegen Hämoglobin wurden daher mittels proteinanalytischer Methoden untersucht, um sicher zu stellen, dass sie Hämoglobin spezifisch binden können. Dies gewährleistet eine gleichbleibende Spezifität des Sandwich-Immunoassays. Herstellungsbedingte und chargenweise Qualitätsunterschiede der Antikörper können somit erkannt und dadurch ggf. entstehende Probleme verringert werden. Neben einer klassischen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot wurden auch eine native Gelelektrophorese und das Dot-Blot-Verfahren durchgeführt.

#### Native PAGE und Western Blot

Bei einer klassischen SDS-PAGE, werden die zu analysierenden Proteine denaturiert und anhand ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die Eigenladung der Proteine wird durch die Verwendung von SDS überdeckt und bewirkt eine negative Ladung der Proteine. Da die Auftrennung gemäß der Molekülmasse erfolgt, können die Proteine einem Größenstandard zugeordnet und identifiziert werden. Das Interesse lag bei dem Aufbau des SERS-Immunoassays auf der Funktionalität des nativen Hämoglobins, weshalb die SDS-PAGE nur zur weiteren Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Antikörper gegenüber Hämoglobin verwendet wurde. Die Ergebnisse der SDS-PAGE sind im Anhang auf Seite 133 Abbildung 54 zu sehen. Daher wurde, um die Funktionalität des nativen Hämoglobins zu überprüfen, eine native Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dadurch werden die natürliche Konformation sowie die physiologischen Eigenschaften des Hämoglobins beibehalten und es erfolgt eine Auftrennung in Abhängigkeit vom Ladungszustand und damit nach dem isoelektrischen Punkt und nach dem hydrodynamischen Volumen. So kann die

Funktionalität der Antikörper sowohl in der denaturierten Konformation als auch in der Quartärstruktur, in der sich das Hämoglobin während des SERS-Immunoassays befindet, überprüft werden. Die Auswahl der monoklonalen und polyklonalen Antikörper erfolgte so, dass sie jeweils an andere Sequenzen des Hämoglobins binden. Aus diesem Grund wurde der monoklonale Antikörper, der an nur ein Epitop bindet, auf den AuNP funktionalisiert (siehe Kapitel 3.3) und der polyklonale Antikörper auf dem Trägermaterial des Immunoassays immobilisiert (siehe Kapitel 3.7). Die Ergebnisse der nativen PAGE mit verschiedenen konzentrierten Hämoglobin-Lösungen sind in Abbildung 21 zu sehen. Neben hohen Hämoglobinkonzentrationen mit 0,3 mg/mL und 0,03 mg/mL wurden noch weitere Verdünnungen mit 0,015 mg/mL und 0,003 mg/mL verwendet.

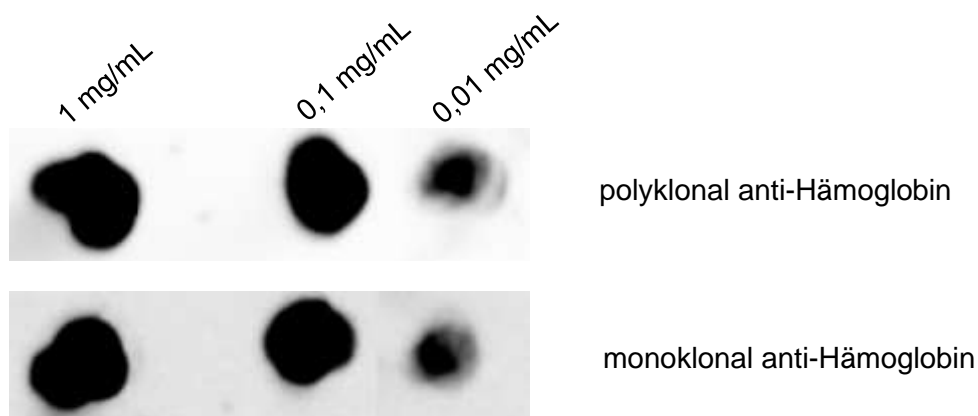


**Abbildung 21:** Western Blot nach nativer Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden Proben mit einer Konzentration von 0,3 mg/mL; 0,03 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,003 mg/mL Hämoglobin. Verwendet wurden ein monoklonaler und ein polyklonaler anti-Hämoglobin-Antikörper. Die Detektion des Hämoglobins erfolgte mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern. Dabei wird ein Chemilumineszenz-Substrat durch die HRP umgesetzt und Licht emittiert, welches mit einem Fotofilm aufgenommen werden kann.

Die beiden Western Blots in Abbildung 21 zeigen deutlich, dass eine Detektion von Hämoglobin unter nativen Bedingungen mit beiden Antikörpern möglich ist. Sowohl der monoklonale als auch der polyklonale Antikörper können Hämoglobin noch bis zu einer Konzentration von 0,015 mg/mL nachweisen. Die Detektionsfähigkeit für die geringste Konzentration mit 0,003 mg/mL ist bei beiden Antikörpern sehr schwach. Ein quantitativer Nachweis wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt, da dies mittels eines Western Blots als nicht unproblematisch zu betrachten ist. Dies ist durch die eventuellen Probenverluste und weitere Faktoren, die das Ergebnis eines Western Blots beeinflussen können, zu begründen<sup>135</sup>. Zudem war es nicht möglich einen geeigneten Größenstandard für die native PAGE zu verwenden, um die Proben eindeutig zuzuordnen. Weiterhin muss beachtet werden, dass die oben gezeigten Ergebnisse der Detektionsfähigkeit zwischen Antikörper und Hämoglobin unter optimalen Bedingungen einer nativen PAGE erreicht wurden. Deshalb sollte im weiteren Verlauf der Versuche darauf geachtet werden, dass Bindungsfähigkeit und Spezifität der verwendeten Antikörper weiterhin gegeben sind. Es ist möglich, dass die Antikörper durch die Funktionalisierung auf den AuNP und die Verwendung in einem Immunoassay andere Eigenschaften zeigen. Zu weiteren Einflüssen, die das Verhalten der Antikörper beeinflussen können, gehören das umgebende Medium, pH-Werte des Systems und eine sterische Hinderung bzw. eine Beeinflussung durch die Anzahl an Antikörpern auf den AuNP.

### Spezifitätsnachweis mittels Dot Blot Verfahren

Der Dot Blot ist eine in der Literatur als schnelle und einfach durchzuführende Alternative gegenüber den zuvor durchgeführten Western Blots aufgeführt<sup>136</sup>. Bei der Methode des Dot Blot erfolgt keine elektrophoretische Auftrennung des Proteins in einem Gel. Das Zielprotein wird direkt auf eine proteinbindende Membran aufgetragen. Die Detektion des Proteins erfolgt analog zu der einer PAGE mittels eines HRP-konjugierten Antikörpers. Dabei wird ein Substrat zu einem chemilumineszierenden Produkt umgesetzt und infolgedessen Licht emittiert. Dieses kann dann mit einem Fotofilm aufgenommen werden. In der Diagnostik wird diese Methode häufig routinemäßig für Screenings verwendet, um bei einer großen Anzahl an Proben eine einfache Detektion des Zielproteins zu ermöglichen. Der Aufwand einer elektrophoretischen Auftrennung des Proteins in einem Gel sowie das anschließende Blotting entfallen<sup>137,138</sup>. Weiterhin bietet dieser Ansatz die Möglichkeit die Cellulosenitrat-Membran, die im weiteren Verlauf als Trägermaterial für den SERS-Immunoassay dienen sollte, im Hinblick auf deren Proteinbindungsfähigkeit zu überprüfen. Die Durchführung erfolgte mit verschiedenen konzentrierten Ansätzen einer Hämoglobinlösung von 1 mg/mL, 0,1 mg/mL und 0,01 mg/mL, siehe Abbildung 22.



**Abbildung 22:** Dot Blot mit Hämoglobinlösungen von 1 mg/mL, 0,1 mg/mL und 0,01 mg/mL. Der polyklonale und der monoklonale Antikörper zeigen ähnliche Intensitäten bei der Detektion des Hämoglobins. Die Detektion ist bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/mL möglich. Die Detektion des Hämoglobins erfolgte mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern. Bei der Umsetzung eines Chemilumineszenz-Substrates durch die HRP wird Licht emittiert, welches aufgenommen werden kann.

Die Auswertung des Dot Blots zeigt eine sehr starke Signalintensität besonders bei den Proben mit den Konzentrationen von 1 mg/mL und 0,1 mg/mL. Das Signal der Detektion von Hämoglobin ist bei beiden verwendeten Antikörpern annähernd gleich und zeigt nur geringe Abnahmen der Signalintensitäten. Dies ist dadurch zu erklären, dass keine elektrophoretische Auftrennung des Hämoglobins erfolgt ist und daher keine potenzieller Probenverlust und Verteilung des Proteins innerhalb des Gels auftritt.

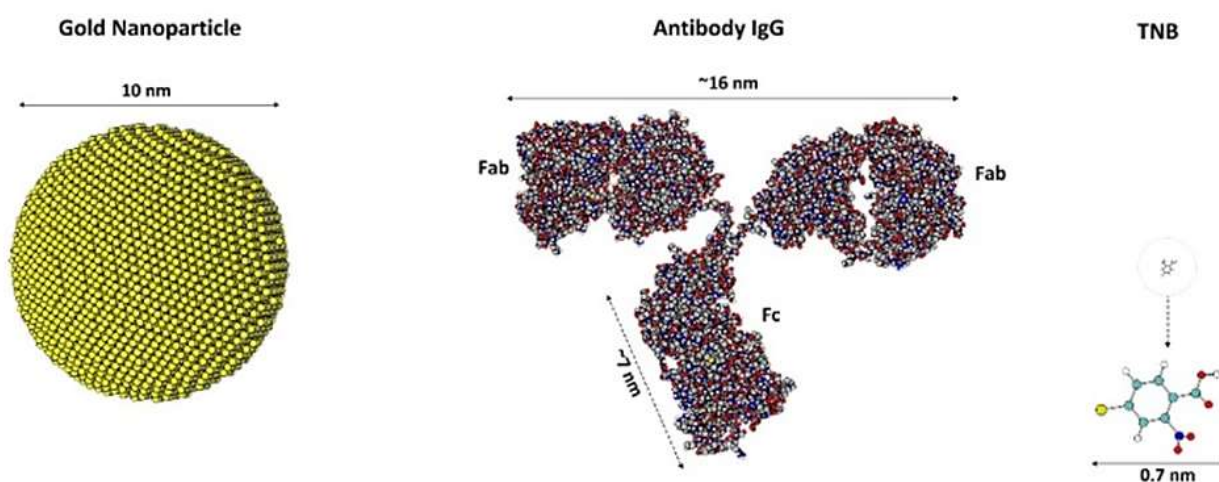
Mögliche weitere Verluste durch das Blotting der Proteine entfallen ebenfalls. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Cellulosenitrat-Membran für eine Immobilisierung von Proteinen sehr geeignet erscheint. Die Proteinbindungsfähigkeit der Membran spricht für eine weitere Verwendung dieser für den Immunoassay. Auffällig ist zudem ein sehr geringer Hintergrund, was auf wenig Kreuzreaktionen der Antikörper und eine hohe Spezifität schließen lässt. Aufgrund des zum Western Blot verschiedenen Ansatzes des Dot Blots sind die Ergebnisse der beiden Methoden nicht ohne weiteres bezüglich der Detektionsgrenzen und Signalintensitäten zu vergleichen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Antikörper eine ausreichende Spezifität aufweisen. Im Allgemeinen sind die erwähnten proteinanalytischen Methoden nicht als quantitativ zu betrachten, sondern zeigen, ob eine gewisse Spezifität des Antikörpers gegenüber dem Protein vorhanden ist. Die Funktionalität der Antikörper muss daher im weiteren Verlauf der Arbeit genau beobachtet und kontinuierlich überprüft werden.

### 4.4 Funktionalisierung der Partikeloberflächen mit Antikörper und Hämoglobin

In diesem Kapitel werden die mit TNB/TNB\* beschichteten AuNP mit den im vorherigen Kapitel getesteten Antikörpern und Hämoglobin funktionalisiert. Mit diesem Vorgehen können die funktionalisierten AuNP auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert werden.

Die Funktionalisierung von Oberflächen mit Proteinen oder spezifischen Antikörpern hängt von mehreren Faktoren ab, die in physikalische und chemische Interaktionen eingeteilt werden können. Zu den physikalischen Interaktionen gehören dabei ionische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Oberflächen und den Antikörpern sowie van-der-Waals Wechselwirkungen durch hydrophobe Anziehungskräfte. Weitere physikalische Wechselwirkungen sind Dipol-Dipol-Wechselwirkungen,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, Metallkoordination oder Streptavidin/Biotin Strukturen. Bei der Chemisorption bieten schwefelhaltige Aminosäuren und in Seitenketten vorhandene Schwefelatome eine hohe Affinität, um an Goldoberflächen binden zu können<sup>139</sup>. Weitere Interaktionen können mit einer Chemisorption von Thiol-Derivaten charakterisiert werden sowie durch die Verwendung von Crosslinking-Strategien mit EDC/NHS<sup>140</sup>. Die Ausbildung einer Proteinhülle, bestehend aus den im vorherigen Kapitel untersuchten Antikörpern, ist essenziell für die weitere Entwicklung des SERS-Immunoassays. Diese „Antikörper-Hülle“ bestimmt im weiteren Verlauf der Funktionalisierung, z.B. auch bezüglich der Bindung des Hämoglobins, wie die Partikel untereinander und mit ihrem umgebenden Medium interagieren. Die Ausbildung solch einer Hülle erfolgt bei nicht funktionalisierten AuNP meist spontan, sobald sich die AuNP mit den Proteinen im gleichen Medium befinden<sup>141</sup>. In der Literatur wird häufig eine Crosslinking-Strategie beschrieben, die durch die Verwendung von

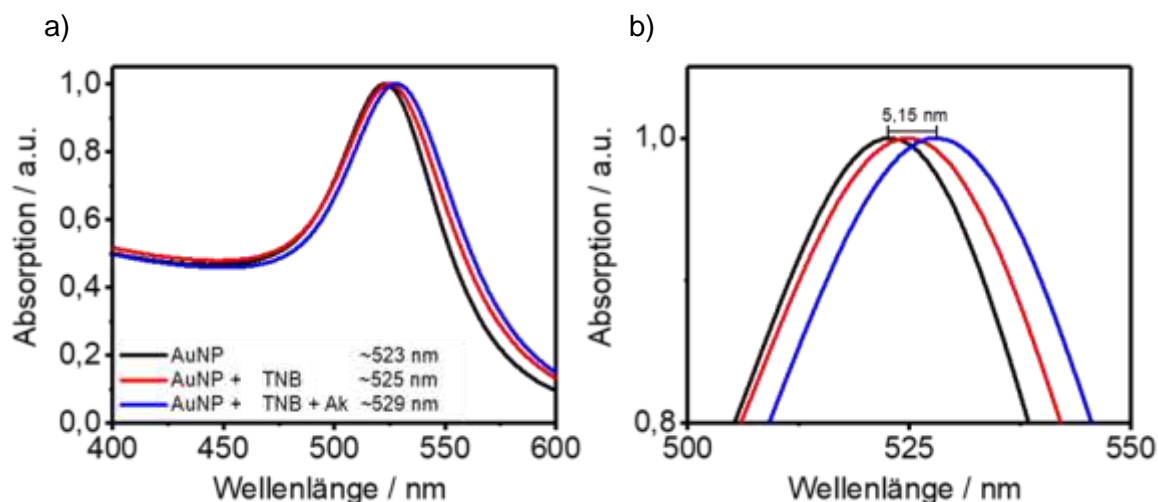
EDC/NHS realisiert wird. Mit Hilfe des Carbodiimids EDC und NHS können Amin reaktive Ester von Carboxylaten erzeugt werden. Dabei reagieren die Carboxylate in Anwesenheit von NHS und dem Carbodiimid EDC zu einem semistabilen NHS-Ester. Dieser Ester reagiert dann mit primären Aminen zu Amiden<sup>142</sup>. Diese Methode führte in dem vorliegenden Testformat jedoch dazu, dass eine nicht kontrollierbare Aggregation der AuNP auftrat. Einflüsse der Verwendung von EDC/NHS auf die Aggregation der AuNP können im Anhang auf Seite 132 Abbildung 53 gesehen werden. Die Aggregation erfolgte bereits vor der Zugabe der Antikörper, die letztlich durch Physisorption an den AuNP gebunden wurden, weshalb diese Ansätze verworfen werden mussten<sup>142,143</sup>. Der hier dargestellte Weg der Physisorption beschreibt die Adsorption der Antikörper auf den mit TNB und TNB\* funktionalisierten Oberflächen der AuNP ohne die Zugabe weiterer Reagenzien für eine chemische Kopplungsreaktion. Der monoklonale anti-Hämoglobin Antikörper wurde an dieser Stelle ausgewählt, da er spezifisch an nur eine der Sequenzen von Hämoglobin bindet, wohingegen der polyklonale potenziell mehr freie Bindungsstellen besetzen kann. Die Veränderungen der Antikörperadsorption an den AuNP können mit der UV/Vis-Spektroskopie einfach und schnell visualisiert werden. Die unterschiedlichen Größenverhältnisse zwischen den AuNP, den Antikörpern und TNB, werden bei einem direkten Vergleich, wie in Abbildung 23 dargestellt, besonders deutlich.



**Abbildung 23:** Größenvergleich eines IgG-Antikörpers mit 10 nm AuNP und TNB. Sowohl Antikörper als auch AuNP sind im Vergleich zu den TNB Molekülen um mehr als das 10 fache größer.

Durch die offensichtlichen Größenunterschiede zwischen TNB und den im Vergleich dazu sehr großen IgG-Antikörpern (150 kDa) lässt sich eine stärkere Verschiebung, bei der Funktionalisierung der AuNP mit den Antikörpern, erwarten. Der Größenvergleich erfolgt an dieser Stelle beispielhaft mit AuNP mit einem Durchmesser  $d \sim 10$  nm AuNP. Diese Größe wurde aus Gründen der Vereinfachung der gezeigten Darstellung verwendet. Die Ergebnisse der Funktionalisierung sind in der folgenden Abbildung 24 dargestellt und zeigen eine deutliche Verschiebung des Absorptionsmaximums der AuNP um  $\Delta\lambda \sim 5$  nm welche durch Mehrfachmessungen reproduziert werden konnten. Dies entspricht einer Verschiebung bedingt durch die Antikörperfunktionalisierung von  $\Delta\lambda \sim 3$  nm.





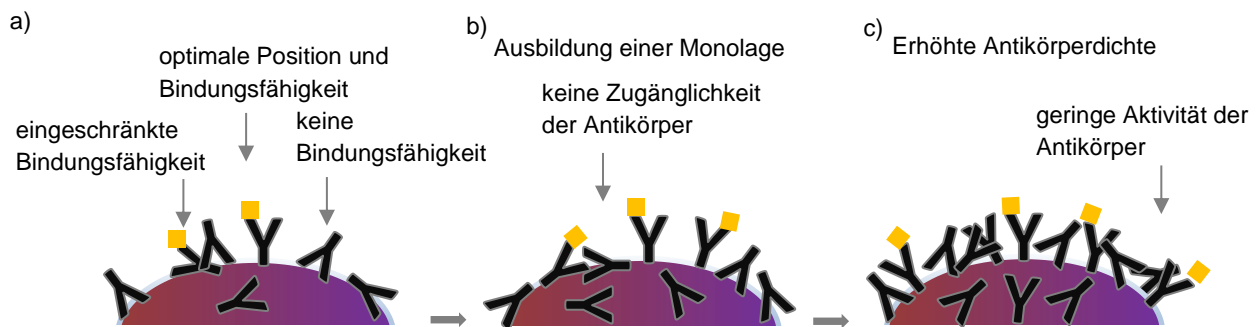
**Abbildung 24:** Messungen von mit Antikörper funktionalisierten AuNP; a) Es erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von  $\lambda \sim 523,68$  nm nach  $\lambda \sim 528,82$  im Falle von anti-Hämoglobin IgG-Antikörpern; b) Vergrößerte Darstellung.

Der Schritt der Funktionalisierung der AuNP mit den Antikörpern, wurde analog zu der mit TNB/TNB\* kontinuierlich überprüft, um eine Aggregation der Partikel möglichst früh zu erkennen und ggf. die Partikellösungen zu erneuern. Insgesamt hat die Funktionalisierung der AuNP, besonders mit Antikörpern, mehrere als kritisch zu betrachtende Einflussfaktoren wie den pH-Wert und die Inkubationszeit. Beide Faktoren können zum Ausfallen der AuNP führen. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert der Suspension zwischen 7,3 und 7,5 beibehalten. Der Wert liegt damit gering über dem isoelektrischen Punkt des IgG-Antikörpers von  $\sim 7,0$  und führt zu keiner Aggregation der AuNP. In der Literatur wurde von Zhang *et al.* beschrieben, dass die Funktionalisierung mit Antikörpern zu einer gewissen Stabilisierung der AuNP führen kann, die zu einer erheblichen Verminderung der SERS-Signalintensität nach der Beschichtung von AuNP mit einer Protein-Hülle führt<sup>144,145</sup>. Dieser Einfluss konnte an dieser Stelle noch nicht beobachtet werden.

Ähnlich der Funktionalisierung der AuNP mit TNB/TNB\* lässt sich ein Langmuir-Adsorptionstheorem abbilden. Wie bei der Anlagerung der TNB-Moleküle kann hier nur schwer eine Aussage darüber gemacht werden, ob eine reine Monolage entstanden ist oder mehrere Lagen an Antikörpern auf der Oberfläche gebunden haben. An dieser Stelle zeigen sich zusätzliche Probleme, die vor allem von der räumlichen Größe der Antikörper bestimmt sind. Durch die Größe der Antikörper entsteht eine gegenseitige sterische Hinderung. Diese determiniert die maximale Anzahl der Antikörper auf den Partikeln und wurde von nur wenigen Arbeitsgruppen bisher beschrieben<sup>103,146</sup>. Daraus lässt sich folgern, dass die Anzahl der möglichen Antikörper auf einem AuNP im Wesentlichen von dessen Größe abhängt.

So haben Schlücker *et al.* für AuNP mit  $d \sim 40$  nm eine maximale Anzahl an IgG-Antikörpern bestimmt, die sich auf  $\sim 234 \pm 23$  Antikörper beläuft<sup>147</sup>. Dieser Wert soll in dieser Arbeit ebenfalls als ein Richtwert für die Anzahl der auf den AuNP befindlichen Antikörper angenommen werden. Bei der Berechnung von Schlücker *et al.* wird jedoch von einer „optimalen“ Kopplung ausgegangen, bei der die Antikörper endständig mit der Fc-Region, an die Partikeloberfläche binden, siehe Abbildung 25a.

Als problematisch anzusehen ist es, dass die Antikörper in verschiedenen Positionen, ungerichtet, auf den AuNP binden können. Dabei werden laut Saha *et al.* folgende Positionen unterschieden, „end on“, welche eine optimale Position darstellt, auf der Seite liegend „side on“ oder „head on“<sup>103</sup>. Durch diese Positionen entstehen unterschiedliche Beladungsdichten der AuNP mit Antikörper und weiterführend auch mit Hämoglobin. Abhängig von der Verfügbarkeit der Antigenbindungsstellen wird unterschiedlich viel Hämoglobin gebunden. Abbildung 25a-c stellt drei typische vorkommende Beispiele für eine unterschiedliche Beladung der AuNP mit Antikörpern dar.



**Abbildung 25:** Beladung der AuNP (lila) mit IgG-Antikörpern (schwarz) und die möglichen Ausrichtungen der Antikörper. Das Antigen ist in Gelb dargestellt; a) zeigt einen wenig beladenen Partikel mit teilweise eingeschränkter Bindungsfähigkeit; b) zeigt ein mäßig beladenes Partikel mit ebenfalls eingeschränkter Bindungsfähigkeit trotz mehr vorhandener Antikörper; c) zeigt einen viel beladenen Partikel mit der gleichen Anzahl an verfügbaren Antigenbindungsstellen. Abbildung verändert nach <sup>103</sup>.

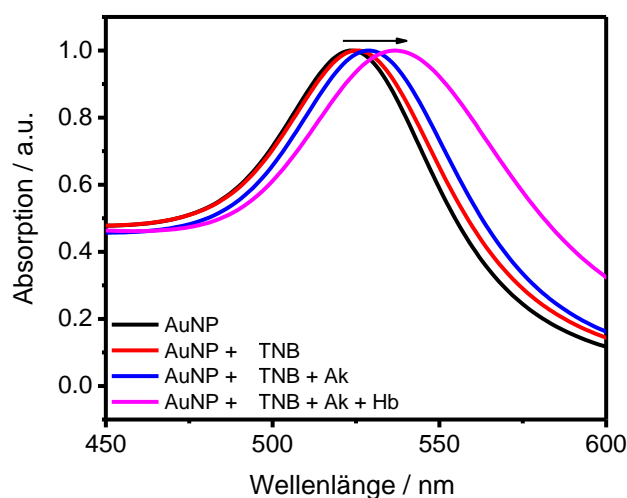
Die unterschiedlichen Positionen der Antikörper auf den AuNP haben einen direkten Einfluss auf die Aktivität der Antikörper. Als Aktivität wird dabei die Fähigkeit der Antikörper verstanden Proteine zu binden. Abbildung 25a zeigt eine nur wenig beladene AuNP-Oberfläche und es fallen bereits an dieser Stelle die nur schwache Funktionalität bzw. Aktivität der Antikörper auf. Bedingt wird die Aktivität durch die Lage der Antikörper auf den AuNP und der Zugänglichkeit der Antigenbindungsstellen. Diese kann in Abbildung 25b durch eine höhere Antikörperdichte zwar gesteigert werden, jedoch erhöht sich gleichzeitig die Anzahl der nicht aktiv zur Verfügung stehenden Antikörper, da ihre Antigenbindungsstellen blockiert sind. Abbildung 25c zeigt eine stark beladene AuNP-Oberfläche mit gleichbleibender Antikörper-Aktivität. Saha *et al.* berichten von lediglich 4% aktiven immobilisierten Antikörpern und, dass erhöhte Antikörperkonzentrationen zu Protein-Protein-Interaktionen führen können, die eine Aggregation der AuNP begünstigen<sup>103</sup>. Ausgehend von dieser Problematik wurde in Anlehnung an Saha *et al.* die Menge an Antikörper bestimmt, die nicht an den AuNP gebunden haben. Diese sollten sich nach dem Zentrifugieren im Überstand der Lösung befinden. Dadurch können Rückschlüsse auf die an den Partikeln gebundenen Antikörper erfolgen. Die Bestimmung der im Überstand befindlichen Antikörper zeigte, dass die Konzentrationen unterhalb des möglichen Detektionslimits des verwendeten Kits lagen und somit nicht zuverlässig war<sup>102,103</sup>. Dies lässt vermuten, dass fast alle in der AuNP-Suspension befindlichen Antikörper an die AuNP gebunden haben. Jedoch lässt diese Bestimmung keine Aussagen darüber zu, mit welcher Position die Antikörper gebunden haben.

Mit zunehmender eingesetzter Antikörperkonzentration konnte kein Anstieg der ungebundenen Antikörper gemessen werden. Dies unterstützt zusätzlich die Theorie, dass nicht nur eine Monolage aus Antikörpern entsteht, sondern sie sich in mehreren Lagen als „Proteinhülle“ an den Partikeln anlagern könnten. Aufgrund der Komplexität solch eines Nachweises ist in den letzten Jahren in der Literatur kontrovers diskutiert worden, ob sich eine Monolage oder mehrere Schichten bestehend aus Antikörpern auf den AuNP anlagern<sup>148</sup>.

Eine weitere Beeinflussung der Bindung der Antikörper an die AuNP stellen der pH-Wert des umgebenden Mediums und der isoelektrische Punkt der Antikörper dar. Besonderes im Hinblick auf die Stabilität der AuNP Suspension muss ein optimaler pH-Wert eingestellt werden, sodass die Partikel durch die Änderung nicht aggregieren, der Antikörper aber dennoch optimale Bedingungen für die Kopplung hat. Um möglichst milde physiologische Bedingungen für sowohl den Antikörper als auch die AuNP zu schaffen, wurde dieser Schritt wie auch die übrigen mit einem HEPES Puffer pH ~7,5 durchgeführt. Der Einfluss des pH ist für die AuNP als wesentlich kritischer anzusehen als für die verwendeten Antikörper, denn sie fallen sehr schnell bei einem zu niedrigen oder zu hohen pH-Wert aus, dies sollte jedoch vermieden werden. Versuche mit pH-Werten < 7,0 und > 8,0 haben nach mehrmaligem Waschen und Zentrifugieren sowie Funktionalisieren der AuNP deutlich zu einem Ausfallen der Partikel geführt und wurden deshalb für die weitere Verwendung verworfen.

### **Beladung der funktionalisierten AuNP mit Hämoglobin**

Die Durchführung des Immunoassays hängt neben der Funktionalisierung der AuNP mit TNB/TNB\* und Antikörpern auch von der Spezifität dieser gegenüber Hämoglobin ab. Die weitere Funktionalisierung erfolgte an dieser Stelle zunächst durch die Zugabe von einem Überschuss an Hämoglobin zu den AuNP. Die spezifische Bindung von Hämoglobin an die auf den AuNP befindlichen Antikörpern hat eine weitere Verschiebung des Absorptionsmaximums der AuNP zur Folge. Die Überprüfung dieser Verschiebung erfolgte ebenfalls mittels UV/Vis-Analyse (siehe Abbildung 26). Dieser Schritt sollte zusätzlich verhindern, dass die AuNP unbemerkt ausfallen. Dadurch kann die UV/Vis-Analyse, als eine Kontrolle bei allen Funktionalisierungsschritten der AuNP genutzt werden.



**Abbildung 26:** Weitere Funktionalisierung der AuNP (bereits mit TNB und Antikörper funktionalisiert) mit Hämoglobin. Deutlich wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums mit zunehmender Beschichtung der Partikel.

Die weitere Funktionalisierung der AuNP mit Hämoglobin führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von  $\Delta\lambda \sim 4$  nm auf insgesamt  $\lambda \sim 533$  nm und weist damit die stärkste Beladung der AuNP auf. Da die Antikörper in unterschiedlicher Position auf den AuNP gebunden sein können, kann die Bindung des Hämoglobins ebenfalls unterschiedlich sein. Eine offensichtliche Aggregation der AuNP durch Hämoglobin wurde an dieser Stelle nicht festgestellt. Mikroaggregate können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

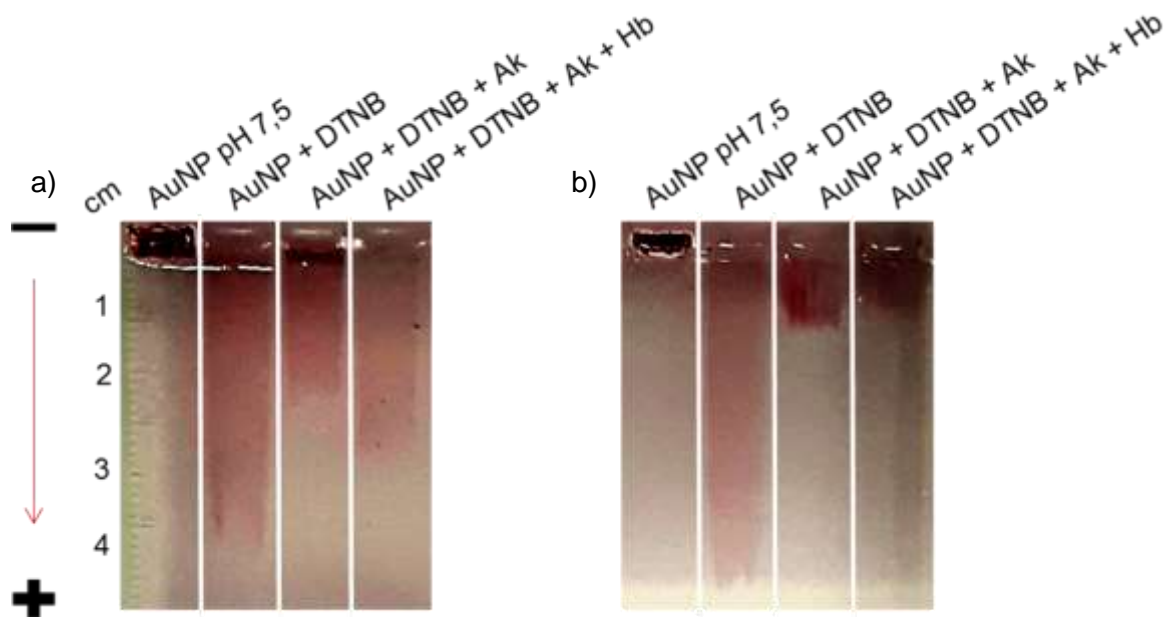
#### 4.5 Funktionalisierungsnachweis der AuNP mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die auch als Elektrophorese bekannte Wanderung von elektrisch geladenen Teilchen durch ein Trägermaterial in einem elektrischen Feld kann neben herkömmlichen Verwendungsgebieten wie der bereits beschriebenen Proteinanalyse auch Aufschluss über den Grad der Funktionalisierung von AuNP geben<sup>149</sup>.

##### Agarose-Gelelektrophorese

Neben dem Nachweis der Funktionalisierung mit spektroskopischen Methoden wie UV/Vis bietet das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese eine weitere Möglichkeit, die funktionalisierten Partikel zu überprüfen. In der Biochemie und der Molekularbiologie werden Agarose-basierte Gele größtenteils dazu verwendet, um DNA-Analysen durchzuführen<sup>16</sup>.

Durch die in den letzten Jahren zahlreichen Anwendungen, die auf der Verwendung von modifizierten AuNP basieren, ist es notwendig geworden, neben dem Nachweis mit UV/Vis noch weitere Methoden anzuwenden, um deren Funktionalisierung abzubilden. Im Gegensatz zu der SDS-PAGE hat bei dieser Art von Gelen die spezifische Ladung einen größeren Einfluss auf die Auftrennung als die Molekülgröße<sup>16</sup>. Bartczak *et al.* beschrieben z.B. die Funktionalisierung von AuNP mit Peptiden oder auch die Biokonjugation von Proteinen und DNA an Nanopartikeln<sup>150</sup>. Diese nicht restriktiven Gele weisen abhängig von der Konzentration des Gels einen großen Porendurchmesser auf, was sie besonders für die AuNP unterschiedlicher Größe geeignet macht<sup>16</sup>. Die Porengröße liegt bei einem 1%igen Gel etwa bei 150 nm und nimmt bei einer abnehmenden Konzentration der Agarose zu<sup>151</sup>. Der Nachweis der Funktionalisierung der AuNP erfolgte analog zu der mittels UV/Vis nach den gleichen wesentlichen Schritten des Protokolls (siehe 3.3), d.h. nach jeder Funktionalisierung mit TNB/TNB\*, Antikörper und Hämoglobin. Die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese sind in Abbildung 27 zu sehen. Gleichzeitig wurde der Einfluss der Funktionalisierung in Bezug auf die Proteinkonzentrationen untersucht.



**Abbildung 27:** Vergleich zwischen unterschiedlich beladenen AuNP; a) zeigt die Beladung der AuNP mit jeweils 0,9  $\mu\text{L}$  Antikörper und Hämoglobin und b) die Beladung mit jeweils 3  $\mu\text{L}$ . Erkennbar ist ein unterschiedliches Laufverhalten der AuNP in Abhängigkeit von der Proteinbeladung.

Die Funktionalisierung und deren Nachweis erfolgte mit einer unterschiedlichen Beladung der AuNP mit 0,9  $\mu\text{L}$  Antikörper-Stammlösung und Hämoglobin, siehe Abbildung 27a und mit einer erhöhten Menge an 3  $\mu\text{L}$  Antikörper und Hämoglobin, siehe Abbildung 27b. Bei der Betrachtung der Gele, fällt zunächst auf, dass die nicht funktionalisierten AuNP in HEPES Puffer pH 7,5 nicht in das Gel wandern. Eine Aggregation der AuNP vor dem Befüllen der Taschen wurde nicht bemerkt. Sie bleiben in den Taschen und zeigen eine dunkle Verfärbung, die dafürspricht, dass die AuNP beim Anlegen der Spannung in den Taschen ausgefallen sind.

Die nur mit DTNB beschichteten AuNP zeigen einen auffällig verschmierten Lauf in das Gel und bilden keine definierte Bande. An dieser Stelle ähneln sich die beiden Ansätze, bei den weiteren treten jedoch Unterschiede im Laufverhalten auf. Die AuNP mit einer Funktionalisierung aus TNB und Antikörper in Abbildung 27a zeigen einen wesentlich längeren Laufweg mit ca. 2 cm in das Gel als diese mit einer höheren Proteinkonzentration in Abbildung 27b mit nur 1 cm. Die Partikel mit der höher konzentrierten Funktionalisierung zeigen einen deutlich kürzeren Laufweg in das Gel und schmieren weniger. Eine definierte Bande ist bei beiden Ansätzen nicht zu erkennen. Das gleiche Verhalten der Partikel gilt für die Ansätze, die zusätzlich mit Hämoglobin funktionalisiert sind. Die Partikel mit der höher konzentrierten Funktionalisierung zeigen einen kürzeren Laufweg von ca. 1 cm in das Gel als diese mit der geringeren Konzentration mit ca. 2,5 cm Laufweg. Der Vergleich der beiden Ansätze zeigt, dass die Oberflächenbeladung der AuNP einen erheblichen Einfluss auf die Oberflächenfunktionalität der AuNP und deren Verhalten hat. Die Partikel mit der stärkeren Beladung scheinen eher dazu zu tendieren auszufallen und größere Aggregate zu bilden, was einen Einfluss auf das Laufverhalten der AuNP innerhalb des Gels hat.

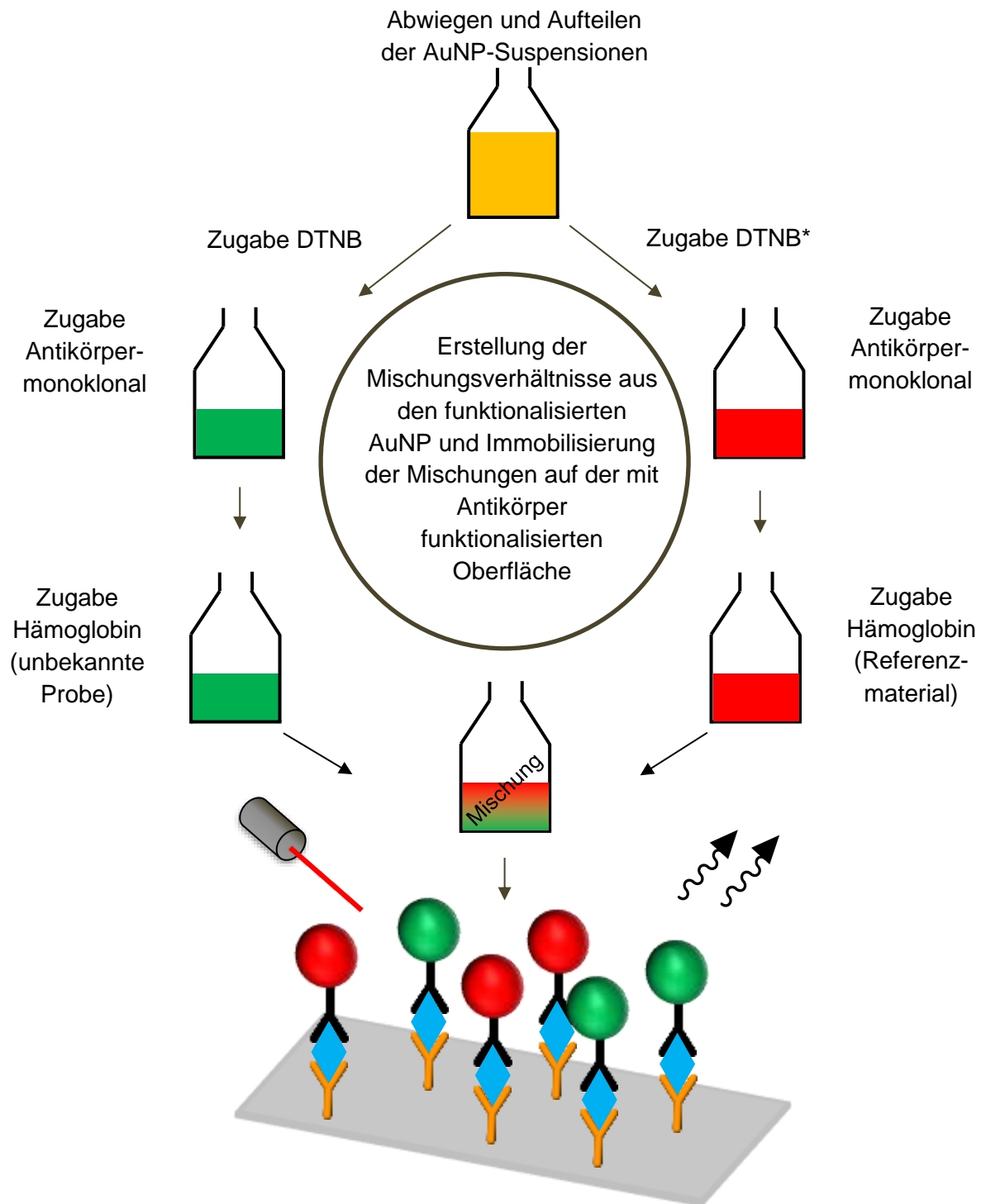
### 4.6 SERS-Immunoassay

Der in diesem Kapitel dargestellte ID-SERS-Immunoassay kombiniert die Methode eines antikörperbasierten Sandwichassays mit der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie. Durch die Immobilisierung der funktionalisierten AuNP auf einem geeigneten Trägermaterial wird die indirekte Detektion des Hämoglobins über das ramanaktive Markierungsreagenz ermöglicht.

Immunoassays finden Verwendung in den verschiedensten naturwissenschaftlichen Disziplinen wie der spezifischen Detektion von Proteinen, Viren und Bakterien sowie im Bereich des therapeutischen Monitorings von Medikamenten, Krankheitserregern oder der Krankheitsdiagnose<sup>17,152–154</sup>. Obwohl sich die Immunoassays in ihrer Anwendung und den verwendeten Materialien je nach Zielmolekül unterscheiden, haben sie alle einen auf bestimmten notwendigen Schritten basierenden Aufbau gemein<sup>155,156</sup>. Dieser Aufbau besteht aus einem geeigneten Trägermaterial, Antikörpern, die gegen das Zielprotein gerichtet sind, einem sekundären Antikörper zur Bildgebung und dem Zielprotein. Das Trägermaterial dient dazu, den AuNP-Komplex, an dem das Hämoglobin spezifisch gebunden ist, zu immobilisieren<sup>157</sup>. Die Spezifität von Immunoassays, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, ist durch die Verwendung geeigneter Antikörper gegeben<sup>158</sup>. Neben der Anwendung klassischer Immunoassays mit primären und sekundären Antikörpern, sind in den letzten Jahren alternative Ansätze hinzugekommen, wie man an den Raman-Spektroskopie basierten Immunoassays sehen kann<sup>154,159</sup>.

In der Literatur sind bereits Modelle beschrieben für die Detektion von Proteinen, krankheitsrelevanten Biomarkern wie Influenza-Viren<sup>152</sup> oder die schon seit längerem angewendeten fluidbasierten Immunoassays<sup>160,161</sup>. Für die Untersuchung von Blut und Biomarkern wie Interleukinen oder Glucose wurden ebenfalls SERS-basierte Anwendungen beschrieben<sup>162,163</sup>. Ein Vorteil, der auf SERS basierenden Immunoassays ist, dass sie wie im vorliegenden Ansatz mit dem Prinzip der ID kombiniert werden können und dadurch das Potential haben als primäres Referenzmessverfahren zu dienen.

Der hier dargestellte SERS-Immunoassay stellt somit ein Bindeglied zwischen Immunoassays, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, und dem Prinzip der ID dar. Dadurch wird die sehr hohe Sensitivität der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie mit den Vorteilen einer Verhältnismethode<sup>9,62,68</sup> kombiniert. Dies ist besonders geeignet, um relevante Biomarker metrologisch genau sogar in geringen Konzentrationen messen zu können. Bei bereits angewandten ID-SERS-Ansätzen für die Quantifizierung von Kreatinin wird dieses in einer nativen und isotonenangereicherten Form verwendet und direkt gemessen. Im Gegensatz zu diesem Testformat zur Quantifizierung, wird in dieser Arbeit eine indirekte Form der Detektion verfolgt<sup>9,67,68</sup>. Dies bedeutet, dass das Hämoglobin nicht in einer isotonenangereicherten Form eingesetzt, sondern über den ramanaktiven Marker TNB/TNB\* nachgewiesen wird. Dieser Ansatz hat den Vorteil, auch Proteine oder andere Moleküle, die nicht in einer isotonenangereicherten Form hergestellt werden können, zu detektieren. Das Protein sollte in der Form eines zertifizierten Referenzmaterials verwendet werden, um metrologischen Standards zu genügen. Dies erlaubt die Rückführung der zu bestimmenden Konzentration auf das SI und bietet die Vergleichsmöglichkeit der unbekannten Probe mit dem Hämoglobin, dessen Konzentration exakt bestimmt ist. Eine weitere Voraussetzung stellt jedoch auch die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper dar. Die Herausforderung besteht darin, die zuvor gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Funktionalisierung der AuNP mit den weiterführenden Untersuchungen für die Immobilisierung auf einer geeigneten Oberfläche zu kombinieren. Der Aufbau des Immunoassays ist in Abbildung 28 schematisch dargestellt.



**Abbildung 28:** Schema des ID-SERS-Immunoassays. Für den SERS-Immunoassay wird eine definierte Menge AuNP aus einem Ansatz entnommen und mit DTNB bzw. DTNB\* in gleicher Weise umgesetzt. Die grünen Kugeln stehen dabei für die Funktionalisierung mit TNB und die roten Kugeln stehen für die Funktionalisierung mit TNB\*. Die weiteren Funktionalisierungen mit Hämoglobin und Antikörper erfolgten für beide Wege analog, wobei der Ansatz mit TNB\* mit einer definierten Menge eines zertifizierten Hämoglobin-Standards, der TNB-Ansatz mit der Probe unbekannter Hämoglobin-Konzentration versetzt wird. Anschließend werden die beiden Ansätze in definierten Mengen gemischt und auf der Oberfläche eines mit Antikörpern funktionalisierten Trägermaterials immobilisiert. Nach erfolgter Immobilisierung kann die Oberfläche mittels Raman-Spektroskopie untersucht werden und es können SERS-Spektren (von TNB/TNB\*) gemessen werden.



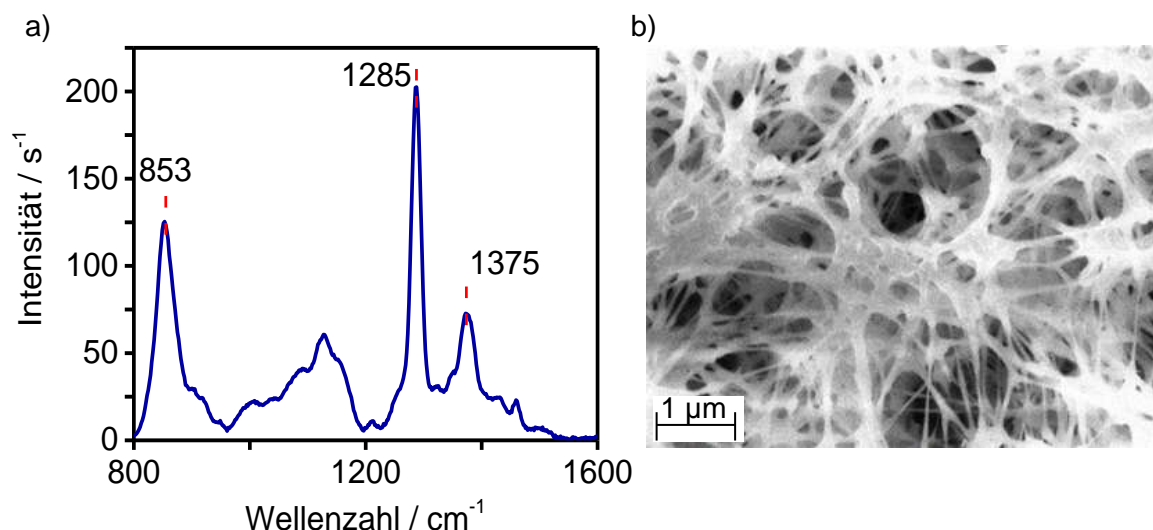
Das Funktionalisieren der AuNP erfolgte in getrennten Ansätzen, die jedoch aus einer definierten Menge an Partikeln entnommen wurden. Die Erstellung der Mischungsverhältnisse, bestehend aus AuNP mit entweder TNB oder TNB\* funktionalisiert, erfolgte erst im letzten Schritt, bevor die AuNP auf dem funktionalisierten Substrat immobilisiert wurden. Für die Gewährleistung der metrologischen Genauigkeit, wurden die benötigten Volumina an den entsprechenden Stellen eingewogen. Dies bezieht sich auf die Einwaage der gesamten benötigten Menge an AuNP, die Menge der AuNP für die weitere Funktionalisierung mit TNB oder TNB\* und die Erstellung der Mischungsverhältnisse. Dadurch können Verhältnismessungen ermöglicht werden. Ein möglicher Probenverlust kann dadurch ebenfalls vernachlässigt werden, da von einer homogenen Durchmischung der Proben ausgegangen wird. Die Bestimmung der unbekannten Hämoglobin-Konzentration kann durch die Verwendung eines zertifizierten Hämoglobin-Referenzmaterials realisiert werden, welches bereits erfolgreich in einer Vergleichsstudie für die Detektion von Hämoglobin verwendet wurde<sup>67</sup>. Das Referenzmaterial zeichnet sich durch eine sehr genaue Konzentration aus, welche mit der HiCN-Methode bestimmt wurde<sup>164</sup>. Die Verwendung des Hämoglobin-Referenzmaterials wird jedoch erst nach einer erfolgreichen Prüfung des SERS-Immunoassays erfolgen. Für eine spätere Quantifizierung müssen bei diesem Schritt die mit TNB\* funktionalisierten AuNP mit dem Hämoglobin-Referenzmaterial funktionalisiert werden. Eine in der Literatur häufig zu findende Variante eines solchen SERS-Immunoassays ist das Aufbringen des Zielproteins direkt auf das Substrat und das Immobilisieren von funktionalisierten AuNP<sup>165</sup>. Dieser Ansatz ist für den vorliegenden SERS-Immunoassay jedoch nicht zielführend. Bei solch einem Testformat kann keine Differenzierung zwischen der unbekannten Probe und dem Material mit der bekannten Konzentration erfolgen.

Für den Aufbau des SERS-Immunoassays musste zunächst noch ein geeignetes Trägermaterial gefunden werden. In den nächsten Kapiteln werden daher noch mehrere Möglichkeiten einer geeigneten Oberfläche für die Immobilisierung der AuNP-Mischungen diskutiert.

### **SERS-Substrat und Immobilisierung funktionalisierter AuNP**

Neben den bereits erwähnten Schwierigkeiten wie der Auswahl eines geeigneten ramanaktiven Markers und der Eignung spezifischer Antikörper ist die Verwendung eines geeigneten Trägermaterials für die Immobilisierung der funktionalisierten AuNP ein weiterer kritischer Punkt bei der Erstellung des SERS-Immunoassays. Beschrieben werden mittlerweile eine Vielzahl an möglichen Anwendungen für SERS-Immunoassays bei denen verschiedene Substrate verwendet werden, um Proteine und andere Strukturen messen zu können. Neben Substraten wie Silizium- oder Mica-Wafern<sup>166</sup> finden am häufigsten Cellulosenitrat-basierte Membranen Verwendung<sup>167,168</sup>. Cellulosenitrat-Membranen zeichnen sich durch mehrere Eigenschaften besonders für die Verwendung im Bereich der point-of-care Diagnostik, wie z.B. einem mikrofluidischen Assay, einem klassischen Immunoassay oder der Detektion von Glucose in Blut, unter Anwendung verschiedener Konfigurationen und Porengrößen aus<sup>157,162,163,169</sup>. Sie sind dabei besonders vorteilhaft durch eine leichte Handhabung, geringe Präparationszeit und eine für die Immobilisierung von Proteinen sehr geeignete Oberfläche, welche eine Funktionalisierung mit Proteinen ohne eine weitere Modifikation ermöglicht<sup>170</sup>. Die Herstellung solcher Membranen erfolgt aus Cellulose, die mit Salpetersäure behandelt wird. Bei den hier verwendeten Membranen sind im Mittel zwei der drei OH-Gruppen der Glucose-Einheiten der Cellulose mit Nitratgruppen verestert, was aufgrund des zwitterionischen Charakters der Nitratgruppe zu einer netto-neutralen Ladung des Cellulosenitrats bei neutralem pH führt. In Abhängigkeit vom Nitratgehalt sind Cellulosenitrate entflammbar oder sogar explosiv („Schießbaumwolle“). Das negative Potenzial auf der Membranoberfläche führt dazu, dass nicht funktionalisierte AuNP, die in Citrat-Puffer stabilisiert sind, nicht haften bleiben. Andere im Bereich der Bioanalytik verwendete Membranen wie Polyvinylidendifluorid (PVDF), können aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit nicht für dieses Testformat verwendet werden. Es gibt beispielhafte SERS-Immunoassays, die mit einer PVDF-Membran erstellt wurden. Dies ist nur möglich, sofern der zu untersuchende Partikelkomplex auf die Membran geblottet wird<sup>171</sup>. Die Cellulosenitrat-Membranen werden in der Literatur als schnelle und einfache Lösung für die Anwendung von SERS-Applikationen<sup>152,172</sup> beschrieben und eignen sich durch ihre hohe Protein-Bindungsfähigkeit<sup>173</sup> gut für eine Funktionalisierung mit Proteinen. Aus diesem Grund wurden diese mit dem polyklonalen anti-Hämoglobin-Antikörpern funktionalisiert, um den AuNP-Komplex über die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung zu immobilisieren. Die Bindungsfähigkeit der Membran gegenüber Proteinen ist abhängig von der Porengröße und erstreckt sich über einen Bereich von 80 – 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und zeigt damit ein hohes Potential für die Immobilisierung von Proteinen oder funktionalisierten AuNP Komplexen<sup>174,175</sup>. Weiterhin muss neben der potenziell guten Eignung der Membranen darauf geachtet werden, wie reproduzierbar die Messungen sind.

Die in dieser Arbeit verwendeten Membranen von Whatman® weisen eine Porengröße von 0,2 µm auf. Membranen mit dieser Porengröße wurden schon erfolgreich für die Erstellung eines SERS-Immunoassays verwendet<sup>153</sup>. Die Oberflächenstruktur einer Cellulosenitrat-Membran unter dem Mikroskop betrachtet erscheint zunächst als eine homogene und gleichmäßig strukturierte Fläche. Betrachtet man diese jedoch unter einem REM werden weitere Strukturmerkmale sichtbar (siehe Abbildung 29).



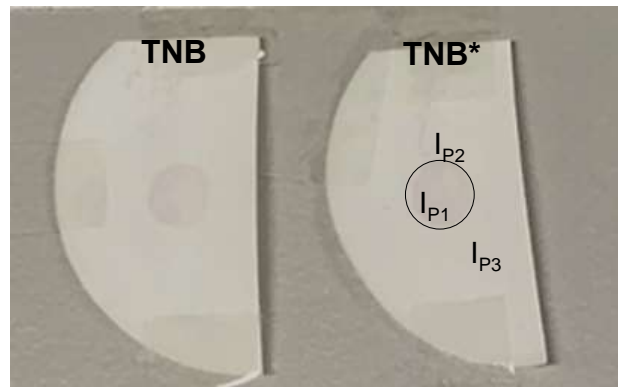
**Abbildung 29:** Aufnahmen einer Cellulosenitrat-Membran. Abbildung a) zeigt eine Raman-Messung der Membran. Die Anregung erfolgte bei 633 nm und es sind deutlich Eigenbanden im Bereich von 853 cm<sup>-1</sup>, 1285 cm<sup>-1</sup> und 1375 cm<sup>-1</sup> zu sehen. Abbildung b) zeigt eine REM-Aufnahme einer nicht funktionalisierten Membran. Die Membran weist eine inhomogene filamentartige Struktur auf. Messparameter: EHT=10.00 KV, Signal A= InLens, WD 4,4 mm Mag=26,73 KX.

Die Struktur der Cellulosenitrat-Membranen weist viele filamentartige Verästelungen und Vertiefungen auf, wodurch die Oberfläche der Membran sehr groß wird. Während der REM-Aufnahmen konnte eine starke Aufladung der Membran beobachtet werden. Dies hat die Fokussierung auf die zu messende Stelle deutlich erschwert. Die Raman-Messung (siehe Abbildung 29a) der nichtfunktionalisierten Cellulosenitrat-Membran zeigt deutlich, dass mehrere prominente Eigenbanden der Membran vorhanden sind, welche einen störenden Einfluss auf die Messungen der Spektren von TNB und TNB\* haben könnten. Diese Banden werden durch die Nitrate der Membran hervorgerufen. Es stellt sich als besonders kritisch dar, dass die Banden bei 853 cm<sup>-1</sup>, 1285 cm<sup>-1</sup> und 1375 cm<sup>-1</sup> auftreten, da die TNB und TNB\* spezifischen Banden der Streckschwingungen mit 1312 cm<sup>-1</sup> und 1336 cm<sup>-1</sup> sehr nahe an denen der Membran liegen. Bei der weiteren Verwendung der Membran muss daher darauf geachtet werden, welchen Einfluss diese Banden auf die SERS-Spektren und deren Auswertung haben werden. Ebenfalls muss geprüft werden, ob sich die Banden konstant verhalten oder sich abhängig von Funktionalisierungen oder dem Blockieren der Membranoberfläche und der immobilisierten Komplexe verändern. Weitere Probleme, die durch die porige Struktur der Membranen auftreten könnten, sind ein Eindringen der Antikörper während der Funktionalisierung der Membran und der zu immobilisierenden AuNP-Komplexe in die Struktur der Membran.

Die Antikörper sind mit einer Größe von ca. 12,7 x 7 nm<sup>16,27</sup>, sowie die AuNP mit ca. 40 nm, erheblich kleiner als der Porendurchmesser der Membran mit 0,2 µm. Das Erzielen eines homogenen SERS-Signals kann dadurch deutlich erschwert werden.

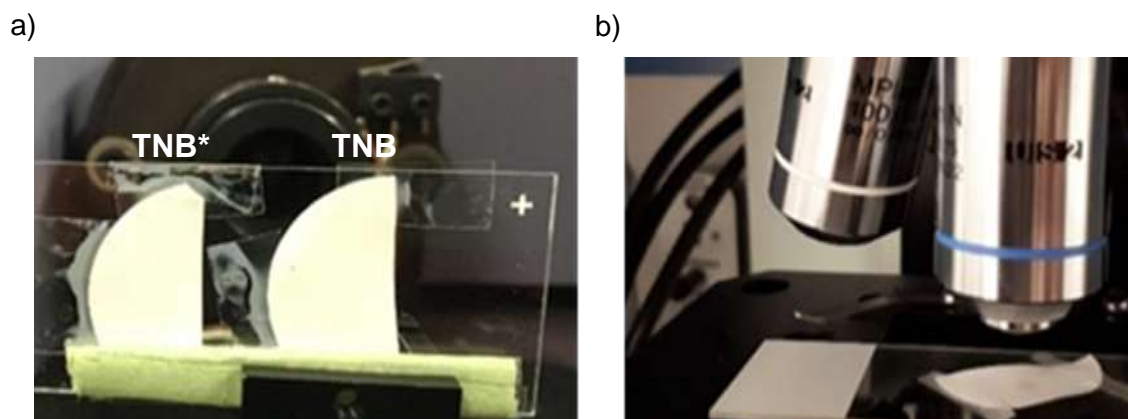
### **Funktionalisierung des SERS-Substrats**

Die Funktionalisierung der Cellulosenitrat-Membran erfolgte zunächst durch das Immobilisieren des polyklonalen anti-Hämoglobin-Antikörpers auf der Oberfläche, der als Bindeglied für die funktionalisierten AuNP (+TNB/TNB\*, + Antikörper, + Hämoglobin) fungiert. Dieser dient dazu, die funktionalisierten AuNP Komplexe auf der Oberfläche spezifisch zu binden. Da der polyklonale anti-Hämoglobin-Antikörper ein Gemisch von Antikörpern darstellt, das an mehreren potenziellen Antigenbindungsstellen des Hämoglobins (Epitope) binden kann als ein nur an ein bestimmtes Epitop bindender monoklonaler Antikörper, bietet sich dessen Immobilisierung auf der Membran an<sup>16,176,177</sup>. In einem ersten Ansatz wurde der Antikörper zur Immobilisierung mittig auf die Cellulosenitrat-Membran getropft. Durch die hohe Proteinbindungsfähigkeit der Membran bindet dieser aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit ohne die Zugabe weiterer Reagenzien. Um eine gute Spezifität des Immunoassays zu erzielen, wurden potenzielle unspezifische Bindungsstellen auf der Membran außerhalb der Stelle, auf der der Antikörper immobilisiert wurde, mittels Milchpulver gesättigt. Der Erfolg eines Immunoassays ist auch dadurch mitbestimmt, wie viele oder wenige unspezifische Reaktionen auf dem verwendeten Substrat auftreten. Die Verwendung von fettfreiem Milchpulver (nonfat-dried milk) ist eine der am häufigsten angewendeten Blockiermedien proteinanalytischer Methoden, weshalb 1%iges Milchpulver in TBST-Puffer verwendet wurde. Weitere Waschschrte verhindern zudem das Vorhandensein von überschüssigem Antikörper. Obwohl durch die Anwendung von Blockiermedien und das Waschen der Membranen unspezifische Bindungen weitgehend reduziert werden können, kann ein kleiner Teil an unspezifischen Bindungen jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Immobilisierung des AuNP-Komplexes sollte dazu führen, dass die funktionalisierten Membranen einen rötlich aussehenden Spot an der für die mit Antikörper spezifisch funktionalisierten Stelle aufweisen. Die spezifische Färbung ist zunächst ein Hinweis auf eine vermeintlich erfolgreiche Immobilisierung der funktionalisierten AuNP auf der Membran. Wie erwartet, ist ein rötlich gefärbter Spot, der in Abbildung 30 zu sehen ist, entstanden.



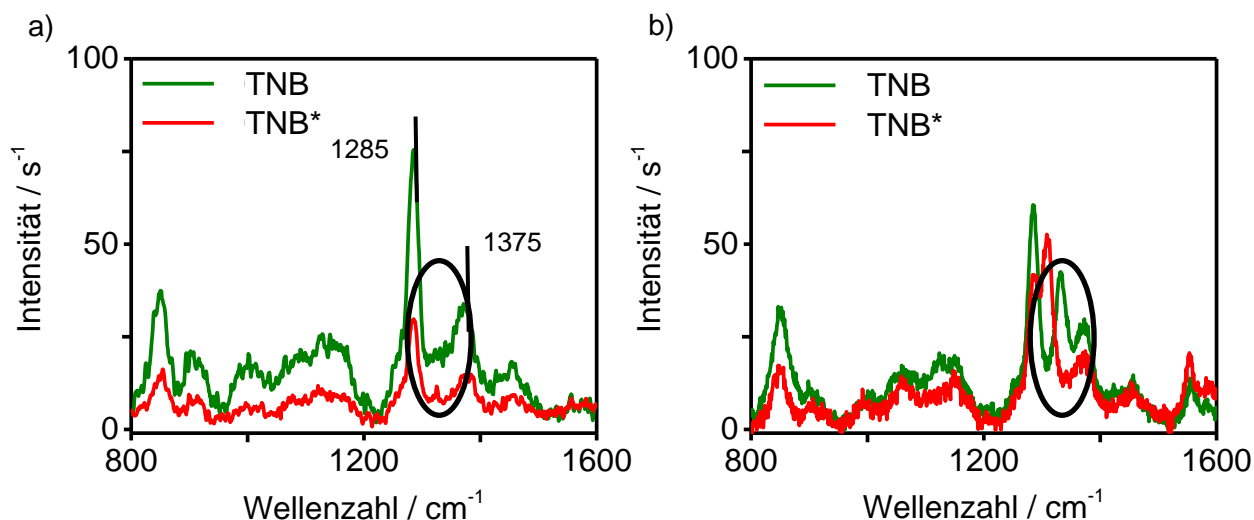
**Abbildung 30:** Mit AuNP-Komplex funktionalisierte Cellulosenitrat-Membran. Deutlich erkennbar sind die rötlich aussehenden Spots, die von den immobilisierten AuNP stammen mit  $I_{P1}$  gekennzeichnet. Der Spot weist am Rand eine stärkere Färbung auf als in der Mitte,  $I_{P2}$ . Die nicht funktionalisierten Bereiche der Membran weisen keine Färbung auf,  $I_{P3}$ .

Der durch die Immobilisierung der funktionalisierten AuNP entstandene Spot ( $I_{P1}$ ) weist eine deutlich erkennbare Abgrenzung gegenüber der restlichen Membran auf. Dies spricht für eine spezifische Bindung des funktionalisierten AuNP-Komplexes auf der Membran. Das Blockieren der Membran führt mit zu einer Minimierung unspezifisch gebundener AuNP, sodass außerhalb des Spots keine Färbung auftritt. Bei genauerer Betrachtung des Spots ist eine unterschiedliche Färbung erkennbar, die am Rand dunkler ist als in der Mitte. Diese so genannte Coffee-Ring Struktur entsteht durch das Trocknen von Flüssigkeit, der Antikörperlösung, auf einer Oberfläche und es kann am Rand des Spots ( $I_{P2}$ ) eine höhere Konzentration an Antikörpern gefunden werden<sup>178,179</sup>. Anhand dieser Annahme lässt sich eine unterschiedliche Intensität an immobilisierten AuNP auf und innerhalb des Spots vermuten bei der  $I_{P2}$  eine höhere Intensität aufweist als  $I_{P1}$ . Die Positionen außerhalb des Spots ( $I_{P3}$ ) sollten hingegen keinerlei TNB oder TNB\* spezifischen SERS-Spektren aufweisen. Da bei  $I_{P2}$  die größte Intensität erwartet wurde, wurde zunächst an dieser Stelle auf der Membran gemessen. Die funktionalisierten Membranen, die einen spezifischen Spot aufwiesen, wurden für die Messungen auf einem Objektivträger mittels Klebestreifen fixiert. Messungen auf den Membranen können entweder in der Makro- oder der Mikrokammer des Raman-Spektrometers (LabRam Aramis) durchgeführt werden, wie in Abbildung 31 gezeigt.



**Abbildung 31:** Darstellung der Messmöglichkeiten des Raman-Spektrometers. Abbildung a) zeigt die Messung in der Makrokammer und b) stellt die Messungen unter dem Mikroskop in der Mikrokommer dar.

Das Messen in der Makrokammer, siehe Abbildung 31a, stellte sich als nicht geeignet heraus, da eine Fokussierung auf den Randbereich des Spots ( $I_{p2}$ ), der sehr schwach zu sehen ist, äußerst schwierig war. Eine standardisierte Einstellung auf den Randbereich des Spots ist somit nicht zu realisieren. Die konfokale Raman-Mikrospektroskopie hat sich dahingegen als zielführend erwiesen und stellt eine Methode der Wahl dar bei der Betrachtung von chemischen oder physikalischen Eigenschaften in mikroskopischen Größenordnungen<sup>180,181</sup>. Strukturell unterschiedliche und heterogene Systeme können so auf Mikrometerebene untersucht werden. Dabei wird der Laser auf ein kleines Volumen fokussiert. Die Apertur des Mikroskops verbessert zudem die laterale und axiale räumliche Auflösung des Mikroskops und ermöglicht so eine Messung des Oberflächen- oder Tiefenprofils der untersuchten Proben<sup>182–184</sup>. Aus diesen Gründen wurde sich bei den nachfolgenden Messungen darauf beschränkt nur noch in der Mikrokommer unter dem Mikroskop zu messen, wie in Abbildung 31b gezeigt. Konfokale Messungen ermöglichen eine bessere Fokussierung auf einen spezifischen Punkt auf der Membran. Die Immobilisierung der funktionalisierten AuNP erfolgte zunächst unter der Verwendung von zuvor beschriebenen Partikelsuspensionen mit einer optischen Dichte von 1. Die Messungen für einen beliebigen Punkt auf dem Rand des Spots,  $I_{p2}$ , sind in Abbildung 32a dargestellt. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass für den Messpunkt mit der größten Anzahl an AuNP keine charakteristischen SERS-Spektren von TNB und TNB\* gemessen werden konnten.



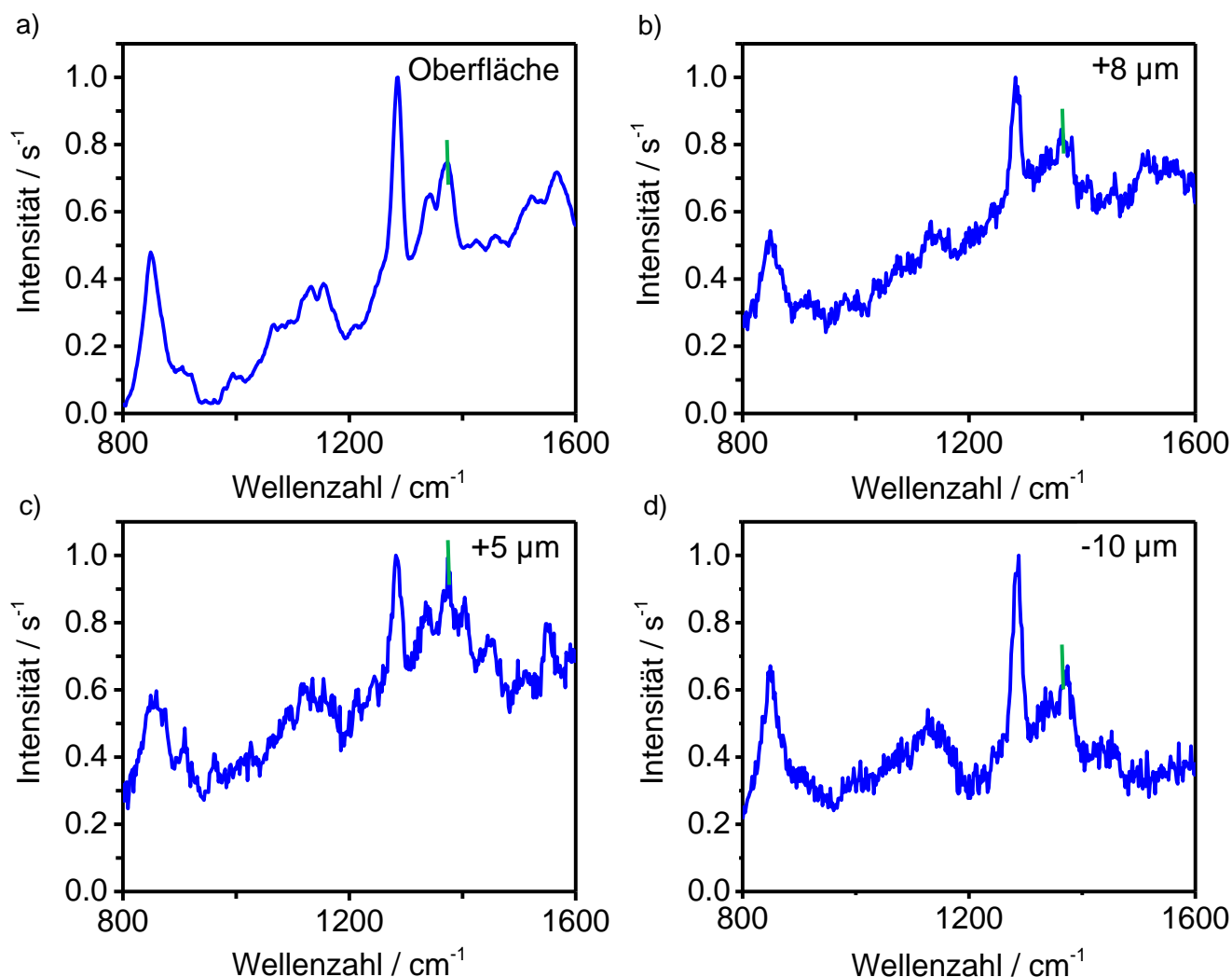
**Abbildung 32:** SERS-Messungen am Randbereich des AuNP-Spots auf der Cellulosenitrat-Membran. Abbildung a) zeigt eine Membran, die mit AuNP-TNB/TNB\*-Antikörper-Hämoglobin einer optischen Dichte von 1 funktionalisiert wurde. Zu erkennen sind die prominenten Eigenbanden der Cellulosenitrat-Membran bei  $1285\text{ cm}^{-1}$ . TNB/TNB\*-Banden bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  sind nicht zu erkennen. In Abbildung b) ist ein Ansatz mit einer optischen Dichte von 2 dargestellt. Zu sehen sind ebenfalls die prominenten Eigenbanden der Membran. Die charakteristischen Banden von TNB/TNB\* haben eine leicht erhöhte Signalintensität.

Die vorhandenen Banden bei  $1285\text{ cm}^{-1}$  und  $1375\text{ cm}^{-1}$  stammen von der Anregung der Nitrobanden innerhalb der Membran und decken sich mit denen des Spektrums in Abbildung 29a. Die anderen Messpunkte  $I_{p1}$  und  $I_{p3}$  wiesen ebenfalls keine auswertbaren TNB/TNB\*-Spektren auf. Eine Ursache für das Fehlen eines ausreichenden Signals in Abbildung 32a kann möglicherweise durch das Verwenden einer Lösung mit der optischen Dichte von nur 1, die einer AuNP-Konzentration von  $9,00 \times 10^{10}$  Partikeln entspricht, hervorgerufen werden. Diese Partikelkonzentration war, für die vorangegangenen Versuche in Suspension ausreichend, kann jedoch für die großflächige Verteilung der AuNP auf der Membran zu gering sein. Das SERS-Signal kann durch die auf der Membran vorhandene geringere Dichte der AuNP reduziert sein. Dadurch könnte kein SERS-Signal zwischen den AuNP erzeugt werden, da diese zu weit voneinander entfernt sind. Aus diesem Grund wurden Messungen mit einer Lösung mit einer erhöhten optischen Dichte von 2 durchgeführt, wie in Abbildung 32b gezeigt, um die Anzahl der auf der Membran befindlichen AuNP zu erhöhen und zu einem eindeutigen SERS-Signal der immobilisierten AuNP zu führen. Aus den Messungen in Abbildung 32b kann entnommen werden, dass eine Erhöhung der optischen Dichte zu einer Erhöhung der Signalintensität geführt hat, die für eine weitere Auswertung dennoch nicht ausreichend ist. Die Streckschwingung der Nitrogruppe von TNB- oder TNB\*-Banden der immobilisierten AuNP bei ca.  $1330\text{ cm}^{-1}$  sind zu erkennen. Bei beiden Ansätzen konnten an den Stellen  $I_{p1}$  und  $I_{p3}$  keine für TNB oder TNB\* charakteristischen Banden gemessen werden. Beide Ansätze zeigen unterschiedliche Intensitäten der Membranbanden bei  $1285\text{ cm}^{-1}$ .

Eine weitere mögliche Ursache für das Fehlen einer ausreichenden Signalintensität ist, dass nicht genug Antikörper auf der Membranoberfläche vorhanden sind, um ausreichend funktionalisierte AuNP immobilisieren zu können, weil sie durch die vielen Poren, mit 0,2  $\mu\text{m}$  Durchmesser, tiefer in die Membran eingedrungen sind. Ein Nachweis, der auf der Oberfläche immobilisierten polyklonalen Antikörper ist schwierig, da diese nicht fluoreszenzmarkiert sind und somit nicht visualisiert werden können. Durch die porige Struktur der Membran können sowohl die AuNP als auch die Antikörper aufgrund ihrer Größe von 40 nm tiefer in die Membran eindringen und sind somit nicht mehr auf der Oberfläche der Membran detektierbar. Eine verlängerte Inkubationszeit führte ebenfalls nicht zu einer Verbesserung der Signalintensität durch mehr auf der Membran befindlichen AuNP. Ein weiterer in Betracht zu ziehender Einflussfaktor stellt das Blockiermedium Milchpulver dar. Durch dieses könnten nicht nur die unspezifischen Bindungsstellen gesättigt werden, sondern auch die funktionalisierten AuNP daran gehindert worden sein, an den Antikörpern auf der Membran zu binden. Dies stünde jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der Proteinanalytik, bei der die auf der Membran funktionalisierten Antikörper trotz der Verwendung eines Blockiermediums eine gute Spezifität zeigten. Um den Einfluss des Blockiermediums weiter zu betrachten, wurden alternativ BSA und eine synthetische Blockierlösung RotiBlock<sup>®</sup> getestet. Es zeichnete sich bei der Verwendung dieser beiden Lösungen ein ähnliches Bild wie zuvor bei Milchpulver gesehen ab. Sobald die Membranen blockiert wurden, war es nicht mehr möglich, ein ausreichendes SERS-Signal von den vermeintlich immobilisierten AuNP zu erzielen. Dies steht in deutlichem Widerspruch zu dem visuellen Eindruck, der von den Membranen gewonnen wurde. Denn es ist eindeutig zu erkennen, dass rötliche Färbungen auf den Membranen vorhanden sind, die von den immobilisierten AuNP stammen. Der Einfluss des Waschens der Membranen sollte nicht zu einer Verminderung der auf der Membran befindlichen AuNP führen, da kein Einfluss auf die Färbung des Spots auf der Membran bemerkt wurde.

Die weiterhin bestehende Problematik, dass ein ausreichendes SERS-Signal von TNB und TNB\* durch die immobilisierten AuNP fehlte, führte zu der Fragestellung, wo sich die AuNP auf oder in der Membran befinden und ob diese überhaupt lokalisiert werden können. Aus diesem Grund wurde ein Tiefenprofil einer funktionalisierten Membran angefertigt, welches weiteren Aufschluss darüber geben sollte. Für das Tiefenprofil der Membran, wurden verschiedene Tiefeneinstellungen während der Messungen in Abbildung 33 vorgenommen. Bei diesen wurde als „Startpunkt“ der Untersuchung eine Fokussierung auf der Oberfläche verwendet. Wie zu erwarten konnte nur eine sehr schwache Bande von TNB detektiert werden, wie in Abbildung 33a zu sehen ist.



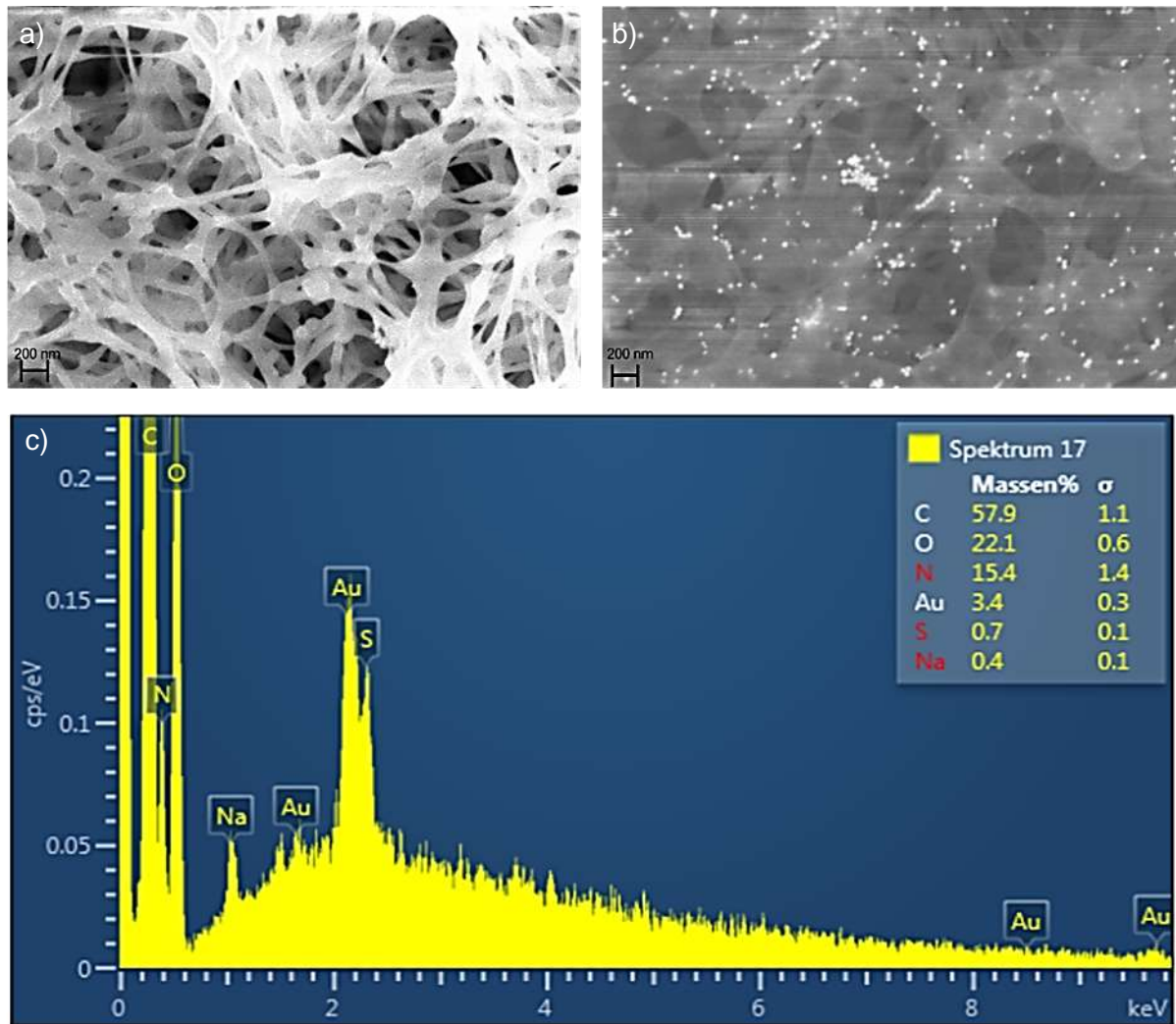


**Abbildung 33:** SERS-Spektren einer Cellulosenitrat-Membran mit funktionalisierten AuNP. Die Abbildungen a-d stellen verschiedenen Fokusebenen dar. Dabei wurde zunächst auf der Membranoberfläche gemessen (a) und in Abständen von (b) +8  $\mu\text{m}$ , (c) +5  $\mu\text{m}$  und (d) -10  $\mu\text{m}$  in der Z-Ebene gemessen. Es erfolgte eine Normierung der Spektren auf 0 und 1. TNB-Bande grün markiert.

Ausgehend von der Oberflächenmessung der Membran wurde die Fokusebene in der Z-Richtung dahingehend verändert, dass beginnend bei dieser in den Abständen von +8  $\mu\text{m}$ , +5  $\mu\text{m}$  und -10  $\mu\text{m}$  gemessen wurde (siehe Abbildung 33b-d). Den Messungen ist zu entnehmen, dass unabhängig von der Fokusebene nur eine geringe Erhöhung der Signalintensität der charakteristischen Bande von TNB und TNB\* bei 1330  $\text{cm}^{-1}$  gemessen werden konnte. Lediglich bei der Messung im Abstand von 5  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 33c), lässt sich eine Bande erkennen, die TNB zugeordnet werden kann. Dies ist bei den Messungen mit +8  $\mu\text{m}$  und -10  $\mu\text{m}$  nicht möglich, (siehe Abbildung 33b und d). Die weiteren Banden bei 1285  $\text{cm}^{-1}$ , die zu sehen sind, stammen von der Membran.

Entgegen der Erwartung konnte die Erstellung eines Tiefenprofils keinen weiteren Aufschluss über die Lokalisation der AuNP auf und innerhalb der Membran geben, weshalb weitere Methoden wie REM und EDX angewendet wurden, um einen Nachweis der AuNP auf der Membran zu erzielen. Diese Messungen ermöglichen die Ermittlung der Elementzusammensetzungen von Strukturen, die zuvor mit REM abgebildet wurden<sup>185</sup>. Mithilfe dieser Methode sollte so die Möglichkeit des Nachweises der immobilisierten AuNP auf der Membran weiterverfolgt werden.

Zu Beginn der Messungen wurde eine Aufnahme einer nicht funktionalisierten Membran gemacht, welche als Vergleichsmöglichkeit gilt (siehe Abbildung 34a). Die funktionalisierte Membran wurde zunächst unter dem REM betrachtet und nach den AuNP gesucht, was sich als schwierig herausstellte, da die Membran eine sehr starke Aufladung zeigte, wodurch eine Fokussierung und resultierende Aufnahmen der AuNP erschwert wurden. Durch die starke Aufladung entsteht zusätzlich eine Drift, die während der Aufnahmen zu einer Verzerrung führen kann. Ein Vergleich mit einer funktionalisierten Membran zeigt, dass auf dieser eine Vielzahl an Partikel zu finden ist, wie in Abbildung 34b zu sehen. Insgesamt zeigt die Beladung der Membran eine inhomogene Partikelverteilung. Weiterhin fällt auf, dass AuNP wie vermutet durch die großporige und unregelmäßige Oberflächenstruktur, tiefer in die Membran eindringen. Die Partikel liegen größtenteils einzeln und mit einem Abstand zueinander vor, der die Erzeugung eines ausreichenden SERS-Signals nicht ermöglicht. Für die Signalerzeugung bei SERS ist ein optimaler Abstand von ca. 2 nm am geeignetsten. Dies wird durch die meisten auf der Membran befindlichen AuNP nicht erreicht. Die an einigen Stellen vorzufindenden Aggregate oder kettenartige Strukturen weisen einen Abstand zueinander von ca. 2 nm auf und können zu einem SERS-Signal führen. Die breite Verteilung der Partikel auf der Membran kann jedoch dazu führen, dass die TNB und TNB\*-Spektren lediglich von den vorhandenen Partikelkomplexen hervorgerufen werden. Eine Fokussierung auf die Aggregate, die zu einem ausreichenden SERS-Signal führen könnten, ist unter dem Mikroskop schwierig durchzuführen, da diese nicht gesehen werden. Mögliche stark mit AuNP beladene Stellen auf der Membran können so verloren gehen und werden bei den SERS-Messungen nicht erfasst.



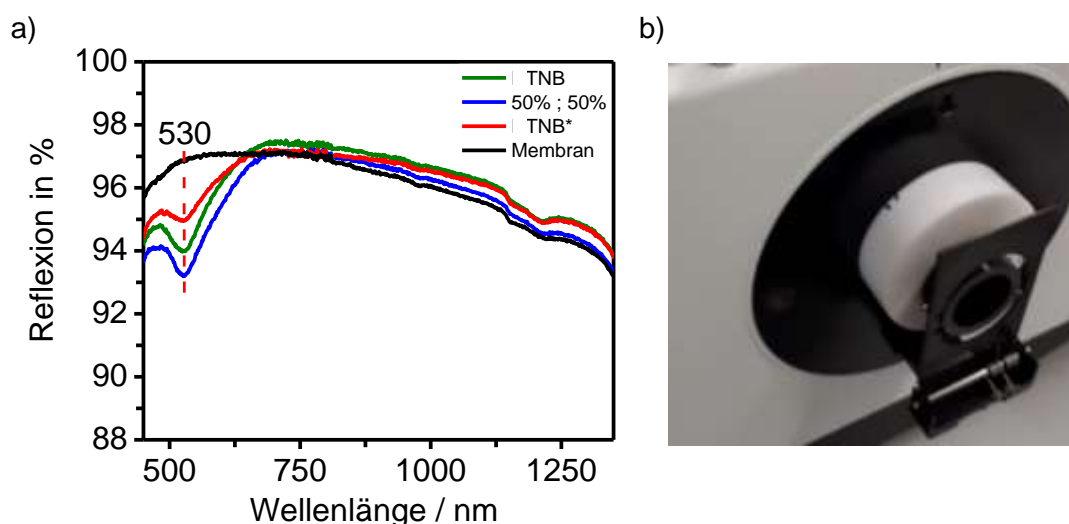
**Abbildung 34:** REM-Aufnahmen und EDX-Messung einer funktionalisierten Membran. Abbildung a) zeigt eine Membran ohne Funktionalisierung; b) zeigt eine funktionalisierte Membran mit immobilisiertem AuNP-Komplex; c) Die EDX-Auswertung zeigt, dass es sich bei den Partikeln auf der Membran um die immobilisierten AuNP handelt.

Nachdem die AuNP auf der Membran lokalisiert werden konnten, wurde eine EDX-Analyse durchgeführt, um beweisen zu können, dass es sich bei den gefundenen Partikelstrukturen tatsächlich um die immobilisierten AuNP handelte. Diese Analyse ist in Abbildung 34c dargestellt. Die durch die Wechselwirkung zwischen den Elektronen und den Atomen der Probe entstehende charakteristische Röntgenstrahlung ist elementspezifisch. Die emittierten Röntgenquanten entsprechen der Differenz der Energieniveaus, die bei der Emission beteiligt sind. Sie sind für die Atome eines Elements spezifisch und können daher einen genauen Aufschluss über die vorhandenen Partikel geben<sup>111,112</sup>. Die Signalintensität wird in Abhängigkeit von der Energie der bei der Messung erhaltenen Röntgenquanten aufgetragen und man erhält elementspezifische Peaks, die im vorliegenden Fall den AuNP zugeordnet werden können<sup>107</sup>. Die Strukturanalyse zeigt deutliche Peaks von Gold mit insgesamt ~3 Massen%, die den AuNP zugeordnet werden können. Weitere auf der Membran nachgewiesene Elemente sind Kohlenstoff mit ~ 58 Massen%, Sauerstoff mit ~ 22 Massen%, Stickstoff mit ~ 15 Massen%, Schwefel mit ~ 1 Massen% und Natrium mit < 1 Massen%, welche größtenteils der Membran zuzuschreiben sind.

Aufgrund von Problemen bei der Fokussierung der AuNP und der starken Aufladung der Membran können die Angaben nur als Massen% interpretiert werden. Die EDX-Analyse konnte somit die Annahme, dass es sich bei den Strukturen auf der Membran tatsächlich um immobilisierte AuNP handelt, bestätigen. Nach dem erfolgreichen Nachweis der immobilisierten AuNP war es besonders widersprüchlich, dass diese nicht dazu geführt haben ausreichende und auswertbare TNB- und TNB\*-Spektren zu erzeugen.

### Reflexion der funktionalisierten Membranen mit immobilisierten AuNP-Komplexen

Reflexionsmessungen können Aufschluss über die generelle Beladung der Membranen mit den funktionalisierten AuNP geben und Unterschiede zwischen den Membranen verdeutlichen. Mit diesem Ansatz können zunächst nur Aussagen über die oberflächlich auf den Membranen vorhandenen Partikel gemacht werden. Es kann so möglicherweise ein Überblick über die gesamte Membran erzielt werden. Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass die auf der Membran vorhandenen AuNP das auftreffende Licht teils absorbieren und dadurch unterschiedlich viel Licht zurückgestrahlt wird. Die Durchführung dieser Messungen erfolgt in einer Ulbrichtkugel des UV/Vis-Spektrometers Lambda 1050. Die Reflexionsmessungen der Membranen mit TNB, 50% TNB/ 50% TNB\* und TNB\* funktionalisierten AuNP weisen, wie in Abbildung 35a zu sehen, ein unterschiedliches Reflexionsverhalten auf.



**Abbildung 35:** Ergebnisse der Reflexionsmessungen mit dem UV/Vis-Spektrometer. a) Die Spektren der Membranen zeigen eine unterschiedliche Reflexion bei der Wellenlänge von 530 nm; b) Messapparatur für das Messen der Membranen ohne Deckel.

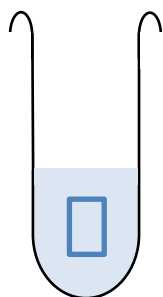
Die Messung einer nicht modifizierten Membran sollte als ein geeigneter Vergleich dienen und zeigt eine Reflexion von annähernd 97%. Bei allen Spektren zeichnet sich eine Abnahme der Reflexion im Bereich von  $\lambda \sim 530$  nm ab. Diese Wellenlänge entspricht dem in den vorherigen Kapiteln ermittelten

Absorptionsmaximums der vollständig funktionalisierten AuNP. Dies unterstützt die REM/EDX-Ergebnisse, dass AuNP erfolgreich auf der Membran immobilisiert werden konnten. Auffällig ist jedoch, dass die Reflexion der Membranen sehr unterschiedlich ist, trotz gleicher Herstellung der Immunoassays und gleicher betrachteter Flächen auf den Membranen. Im Vergleich zur nicht modifizierten Membran, ist eine Verminderung der Reflexion um 2,9% für TNB, bei TNB\* um 2% und bei einem Mischungsverhältnis von 50% TNB;50% TNB\* um 3,7% zu verzeichnen. Dies kann, auf eine unterschiedliche Beladung der Membran oder die Bildung von Aggregaten hinweisen, wie sie teilweise bei REM gesehen wurden. Nanopartikelaggregate führen zu einer veränderten Reflexion und Streuung des auftreffenden Lichts. Eine eindeutige Korrelation zwischen den Reflexionsmessungen und den SERS-Messungen konnte nicht gefunden werden. Dies unterstützt ebenfalls die Ergebnisse, dass trotz der Beladung der Membran mit den funktionalisierten AuNP, keine verbesserten SERS-Spektren gemessen werden konnten.

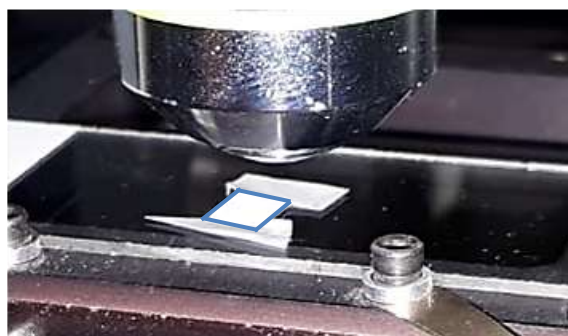
### Inkubation der gesamten Membran

Durch die weiterhin bestehende Problematik bei den SERS-Messungen der immobilisierten AuNP auf den Membranen wurde der Versuchsansatz verändert, sodass die Membranen nach der Immobilisierung des Antikörpers nicht mehr blockiert wurden. Dies sollte einen möglichen negativen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der funktionalisierten AuNP auf der funktionalisierten Membran verhindern. Da nicht geklärt werden konnte, welcher Einflussfaktor die Detektion der immobilisierten Partikel verhinderte, wurde die gesamte Fläche der zugeschnittenen Membran mit dem polyklonalen Antikörper funktionalisiert. Die Inkubation mit den funktionalisierten AuNP erfolgte ebenfalls auf der kompletten Fläche der Membran, wie in Abbildung 36a zu sehen ist. Mit diesem Ansatz konnte die gesamte Fläche der Membran als potenzielle Messfläche verwendet werden, siehe Abbildung 36b.

a)



b)

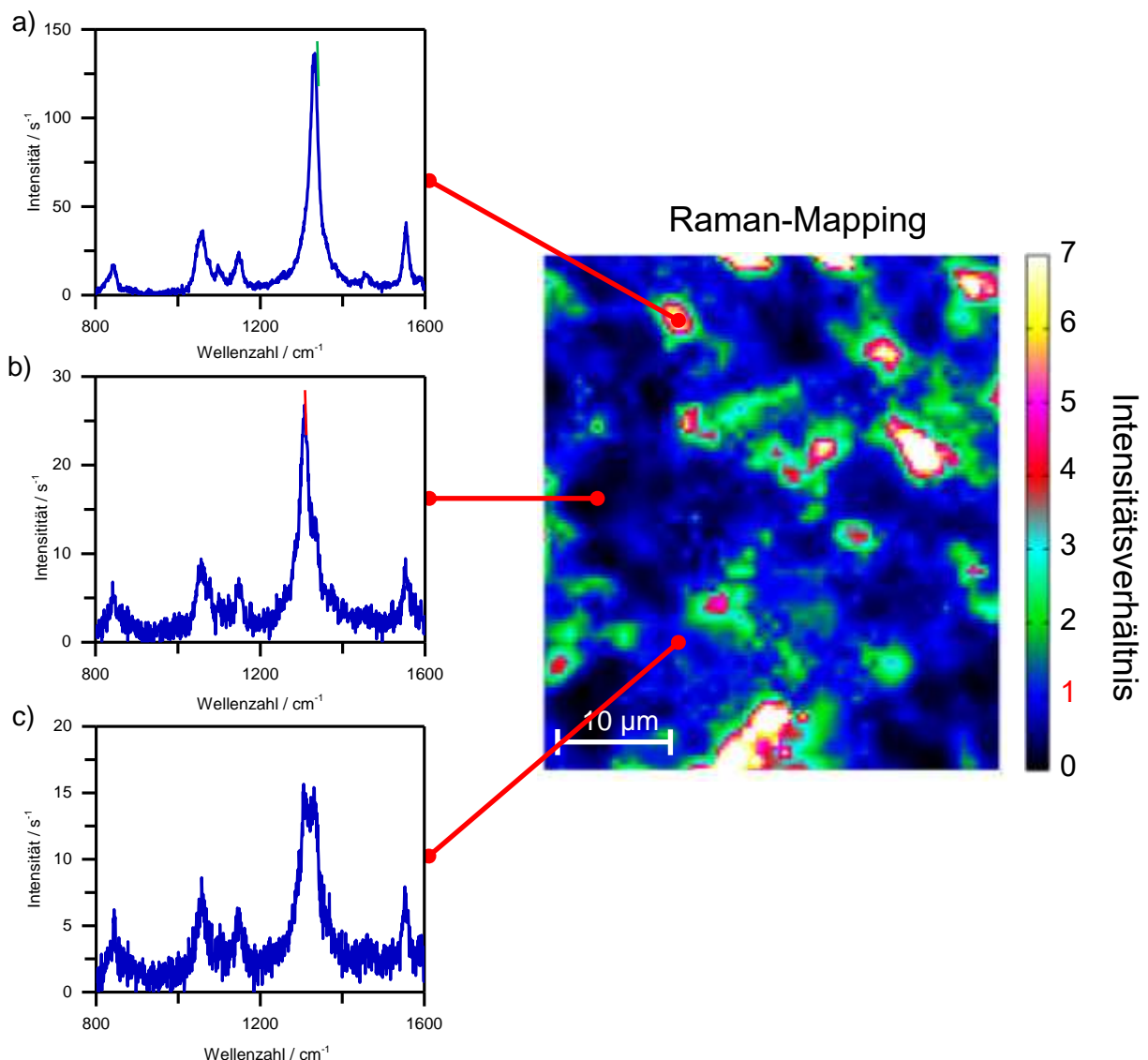


**Abbildung 36:** Schema der Membranfunktionalisierung und Messapparatur. a) Zeigt die Inkubation der gesamten Membran in der Antikörperlösung oder der AuNP Suspension; b) Messaufbau für die Messungen in der Mikrokammer.

Durch die gute Proteinbindungsfähigkeit der Membranoberfläche, sollte eine komplette Funktionalisierung durch die Inkubation in der Antikörperlösung möglich sein. Problematisch könnte an dieser Stelle sein, dass neben den Antikörpern auch vermehrt die AuNP in tiefere Ebenen der Membran gelangen können. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Membran vollständig in der Lösung befindet, um eine gleichbleibende Beladung der Membran mit Antikörpern zu gewährleisten. Die Membranen wiesen eine rötliche Färbung auf, ähnlich wie sie bei der Platzierung von Spots auf den Membranen zu sehen waren. Dies wurde als eine erfolgreiche Immobilisierung der funktionalisierten AuNP-Komplexe gedeutet und es erfolgten Messungen in der Mikrokammer des Raman-Spektrometers. Durch die vorgenommenen Veränderungen des Versuchsansatzes konnten zum ersten Mal TNB- und TNB\*-Spektren mit einer ausreichenden Intensität, die für eine weiterführende Auswertung des Testformats dienen können, gemessen werden.

Um die am besten geeigneten Einstellungen und Messparameter für die Mischungsansätze zu finden, wurden zunächst drei Verhältnisse gemessen: TNB, TNB\* und 50% TNB/50% TNB\*. Im Vergleich zu den am Anfang dargestellten Messungen in den AuNP-Suspensionen mussten die Messparameter jedoch angepasst werden. So zeigte sich, dass beispielsweise die Akkumulationen von mehr Messungen ein besseres Raman-Spektrum erzeugte. Für das Erstellen eines Regressionsmodells ist es vorteilhaft, möglichst viele Messungen in das Modell einfließen zu lassen, um dessen Genauigkeit zu erhöhen. Aus diesem Grund wurden mindestens drei Messungen auf jeder Membran gemacht. Im Verlauf der Messungen auf den Membranen fielen markante positionsabhängige Veränderungen der Spektren der Mischungsverhältnisse auf. Diese Unterschiede haben sich durch eine unterschiedliche Wiedergabe der Mischungsanteile aus TNB oder TNB\* bemerkbar gemacht. Dies bedeutet, dass nicht ein Mischungsverhältnis von 50% TNB und 50% TNB\*, was einem Verhältnis von 1:1 entspricht, abgebildet wurde. Bei einer korrekten Wiedergabe eines 50:50 Mischungsverhältnisses, würden TNB und TNB\* annähernd gleich intensive Nitrobanden, bei ca.  $1330\text{ cm}^{-1}$ , innerhalb des Spektrums zeigen. Wechsel der Mischungsverhältnisse, bei denen entweder TNB oder TNB\* überwiegt, können nicht durch eine Auftrennung der TNB- und TNB\*-Komponenten der Mischungsverhältnisse begründet werden, da von einer homogenen Mischung der verwendeten Probe ausgegangen wird. Die Ursache liegt möglicherweise in einem vorhergehenden Schritt bei der Erstellung des SERS-Immunoassays. Bei den Messungen zeigte sich, dass die detektierten Intensitäten (bzw. die Mischungsverhältnisse) ortsabhängig zwischen TNB und TNB\* schwanken, und von den erwarteten Verhältnissen abweichen. Die Schwankungen können auf grundlegende Probleme hindeuten. Dadurch wird eine Auswertung von einzelnen gemessenen Spektren erschwert, denn es ist nicht möglich zu bestimmen, ob das Verhältnis tatsächlich 50% TNB und 50% TNB\* entspricht. Das notwendige Testformat mit 11 Mischungsverhältnissen konnte so, mittels dieser Spektren nicht erstellt werden, da davon ausgegangen werden musste, dass je nach betrachtetem Punkt auf der Membran das ursprüngliche angesetzte Isotopenverhältnis nicht abgebildet werden konnte. Diese Auffälligkeit hat sich bei allen angesetzten und auf den Membranen immobilisierten Mischungsverhältnissen gezeigt und wiederholt.

Bei der Erstellung der Mischungsverhältnisse wird von homogenen Mischungen der Komponenten (AuNP mit TNB oder TNB\* + Antikörper + Hämoglobin) ausgegangen, die auf den Membranen immobilisiert werden. Eine spätere Auftrennung in die einzelnen Komponenten ist auszuschließen. Da sich die Durchführung von Einzelmessungen auf den Membranen als wenig geeignet darstellte, um die angestrebte Messreihe zu erstellen, wurde nach einem weiteren Lösungsansatz und der Ursache für die Problematik der unterschiedlich auftretenden Mischungsverhältnisse gesucht. Neben den bereits dargestellten Einzelmessungen bietet die Raman-Mikroskopie die Möglichkeit der Durchführung von Mappings eines bestimmten Bereiches auf der zu untersuchenden Oberfläche. Dadurch ist eine zusätzliche Möglichkeit der Charakterisierung der AuNP Verteilung auf der Membran gegeben. Da die Membranen jeweils mit den homogen gemischten Ansätzen der AuNP-Mischungsverhältnisse inkubiert wurden, sollten auf jeder Stelle der gemessenen Bereiche auf den Membranen ähnliche Spektren zu sehen sein (siehe Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Darstellung eines Raman-Mappings mit drei herausgegriffenen Einzelspektren eines Mischungsverhältnisses von 50% TNB und 50% TNB\*. Das Mapping zeigt eine Fläche von 40 μm x 40 μm. Die so entstandene Vielzahl an Spektren gibt einen Überblick über die auf der Membran immobilisierten AuNP. Die Einzelspektren zeigen ein sehr unterschiedliches Mischungsverhältnis. Die Spektren a) und b) zeigen TNB (grün markiert) und TNB\* (rot markiert) nur das Spektrum c) zeigt das auf der Membran immobilisierte Mischungsverhältnis von 50% TNB; 50% TNB\*.

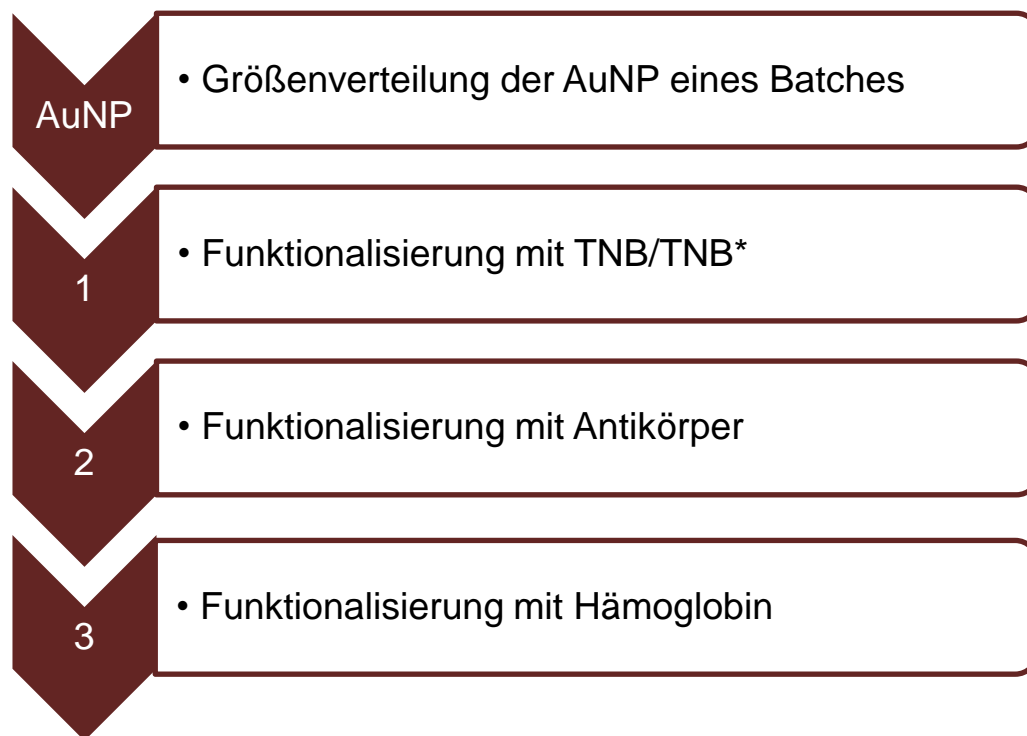
Bei der so entstandenen Vielzahl an gemessenen Spektren konnte ein Überblick über die Verteilung der auf der Membran befindlichen AuNP gewonnen werden. Es zeigte sich mit zunehmender Anzahl an durchgeführten Mappings immer deutlicher, dass sich die Verteilung der Mischungsverhältnisse bzw. die Verhältnisse der 50:50 Mischung positionsabhängig ändern. Es befinden sich Stellen mit einem Konzentrationsmaximum von entweder nur TNB oder TNB\* siehe Abbildung 37a und b. Nur die dunkelblauen Bereiche auf der Membran entsprechen dem erwarteten Verhältnis von 50% TNB und 50% TNB\* (siehe Abbildung 37c). Dies lässt zunächst vermuten, dass an den Messstellen, welche stark vom Verhältnis 1:1 und somit dem vorgegebenen Mischungsverhältnis abweichen, nur AuNP mit TNB oder TNB\* immobilisiert wurden. Es hat scheinbar eine partielle Aufteilung stattgefunden.



In Bezug auf die Herstellung und die Inkubation der Membranen mit den AuNP-Ansätzen ist dies besonders widersprüchlich, da für die ID eine homogene Durchmischung der AuNP in allen Teilen der Suspensionen ausgegangen wird. Dies deutet allerdings darauf hin, dass die AuNP während eines Schrittes der Funktionalisierung Aggregate und Cluster bilden und so zu einer Veränderung der Spektren auf der Membran führen könnten. Ein Einfluss der Membran auf eine mögliche Auftrennung der homogenen Lösung ist auszuschließen. Die Membran kann keinen Effekt auf die AuNP-Lösung haben, der zu einer Auftrennung der einzelnen Komponenten führt. Eine Auswertung dieser Spektren für die Erstellung einer Messreihe ist so nicht möglich, da nicht sichergestellt werden kann, ob das Verhältnis tatsächlich dem entspricht, das zuvor immobilisiert wurde. Durch diese Problematik fließen Spektren in die Auswertung ein, die nicht das entsprechende hergestellte Verhältnis aufweisen. Dies kann das zu erstellende Testformat erheblich verschlechtern. Hinzu kommt ein weiteres Problem für die Auswertung. Die Spektren weisen teilweise sehr geringe Intensitäten auf. Dies ist problematisch für die Auswertung und zeigt zudem, dass die Funktionalisierung der Membran bzw. die Immobilisierung und die Messungen der betrachteten Fläche weiterhin verbessert werden müssen. Für eine geeignete Auswertung der Spektren wurde aus diesem Grund eine weitere Methode in Betracht gezogen. Eine Mittelung der Spektren und eine anschließende Clusteranalyse ergab kein zufriedenstellendes Ergebnis. Deshalb wurde sich im weiteren Verlauf der Versuche zunächst darauf beschränkt eine mögliche Ursache für diese Problematik zu finden, um diese effizient beheben zu können.

### **Ursachenbetrachtung der Clusterbildung**

Die Heterogenität der auf der Membran immobilisierten Partikel konnte durch eine Mittelung der Spektren nicht minimiert werden, sodass keine geeignete Auswertung und Erstellung einer Messreihe möglich waren. Deshalb werden die Ursachen der Entstehung des Problems genauer betrachtet. Potenzielle Aggregate der AuNP stellen ein grundlegendes Problem für die Erstellung des SERS-Immunoassays dar. Die erhaltenen SERS-Spektren wären in diesem Fall durch die Aggregation der AuNP so stark beeinflusst, dass eine Konzentrationsbestimmung von Hämoglobin nicht möglich wäre. Sobald eine der AuNP-Lösungen Aggregate aufweist, ist diese als hinfällig zu betrachten und neu anzusetzen. Als potenzielle Ursache für die Entstehung der Partikelaggregate kommen mehrere elementare Prozessabschnitte bei der Herstellung der funktionalisierten AuNP in Betracht. Die elementaren Prozessabschnitte sind die Zugabe von TNB und TNB\* zu den AuNP, die Funktionalisierungen mit Antikörper und Hämoglobin sowie die einzelnen Zentrifugationsschritte. Die kritischen Schritte der Funktionalisierung der AuNP sind in Abbildung 38 dargestellt.



**Abbildung 38:** Darstellung der einzelnen Funktionalisierungsschritte der AuNP. Jeder dieser Schritte beinhaltet die Möglichkeit der Entstehung von AuNP-Aggregaten. Die Zentrifugationsschritte zwischen den Funktionalisierungen sind ebenfalls Einflussfaktoren für eine Aggregation der AuNP.

Die Betrachtung der Ursache für die Aggregatbildung der AuNP beginnt bei der Verwendung der AuNP-Suspensionen. In der Literatur werden verschiedene Theorien, die das potenzielle Aggregieren der AuNP begünstigen, beschrieben. Die DLVO-Theorie, benannt nach Derjagun, Landau, Verwey und Overbeek<sup>186</sup> sagt, dass die Stabilität von Kolloiden abhängig ist von der Balance zwischen anziehenden van-der-Waals-Kräften und abstoßenden Doppelschichten (Helmholtz-Schichten) um die AuNP.

Eine inhomogene Größenverteilung der AuNP ist bei der DLVO-Theorie zunächst von geringerer Bedeutung, da bei ähnlich großen AuNP, wie sie in der Ausgangssuspension mit 37 nm – 43 nm vorliegen, von einer symmetrischen Situation ausgegangen wird. Weitere Einflussfaktoren stellen die elektrostatische und die sterische Stabilisierung dar. Bei einem niedrigen Salzgehalt oder einer hohen Oberflächenladungsdichte dominiert der Anteil der Abstoßung durch die Doppelschicht. Bei einem hohen Salzgehalt oder einer niedrigen Oberflächenladungsdichte dominiert hingegen die Anziehung der van-der-Waals-Kräfte<sup>186,187</sup>. AuNP, die in Suspension vorliegen, werden anhand der beschriebenen Einflussfaktoren miteinander interagieren und sich, sofern die Ladungsverteilung durch unterschiedlich abgeschirmte Potenziale nicht einheitlich negativ ist, anziehen und zunächst kleinere Dimere und dann größere Aggregate bilden, bis sie vollständig ausfallen. Die DLVO-Theorie geht vor allem auf die Entstehung von Dimeren und den Anfang der Instabilität von Partikel-Suspensionen ein. Durch diese anfänglichen Dimere wird die Entstehung eines instabilen Kolloids begünstigt. Es lagern sich folglich immer mehr AuNP an die Dimere an, bis das instabile Kolloid letztendlich ausfällt und unlösliche AuNP-Aggregate aufweist. In solch einem Fall ist die AuNP-Lösung unbrauchbar für den angestrebten

SERS-Immunoassay. Die verwendeten AuNP-Suspensionen wurden daher genauestens vor und während der Versuchsreihen mit UV/Vis untersucht, um die oben genannte Problematik der Entstehung von Dimeren und Aggregaten zu erkennen. Mittels UV/Vis konnten keine Anzeichen für eine Entstehung von einer instabil werdenden Suspension in den Ausgangslösungen gemessen werden. Die Stabilität der AuNP ist in den Ausgangslösungen durch eine Pufferung in Citratpuffer und im weiteren Verlauf durch das Umpuffern in HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 gegeben<sup>186,187</sup>.

Viele Nanopartikel weisen jedoch eine hohe Tendenz auf, in physiologisch relevanten Puffern Aggregate auszubilden, wie Cukalevski *et al.* herausfanden<sup>188</sup>, was einen sehr starken Einfluss auf die AuNP durch den verwendeten HEPES-Puffer bedeuten könnte. Ein weiterer Einflussfaktor für das Entstehen von Aggregaten ist die OD der vorliegenden Partikel-Suspension. Sind viele AuNP in der Lösung vorhanden, so steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass sie auf andere Partikel treffen und Dimere sowie später Aggregate bilden. Die Aggregate können jedoch auch durch das Zentrifugieren nach der Zugabe von TNB und TNB\* verursacht werden. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten, wie die Aggregate an dieser Stelle entstehen könnten. Entweder werden schon bestehende Dimere verstärkt oder sie entstehen erst durch die Zentrifugation. Weiterhin ist die Stabilität der AuNP vom pH-Wert des verwendeten Puffers abhängig. Ein pH-Wert des umgebenden Mediums von <7,0 und > 8,0 führt zu einer Instabilität des Kolloids und dadurch zu einer Aggregation der Partikel. Bei der Betrachtung dieser Faktoren, die bereits im Anfangsstadium der Partikelfunktionalisierung eine Aggregation begünstigen, müssen die AuNP sehr sorgfältig behandelt werden. Zusätzlich gibt es weitere Einflussfaktoren durch die Zugabe von Antikörper und Hämoglobin die im Folgenden genauer betrachtet werden.

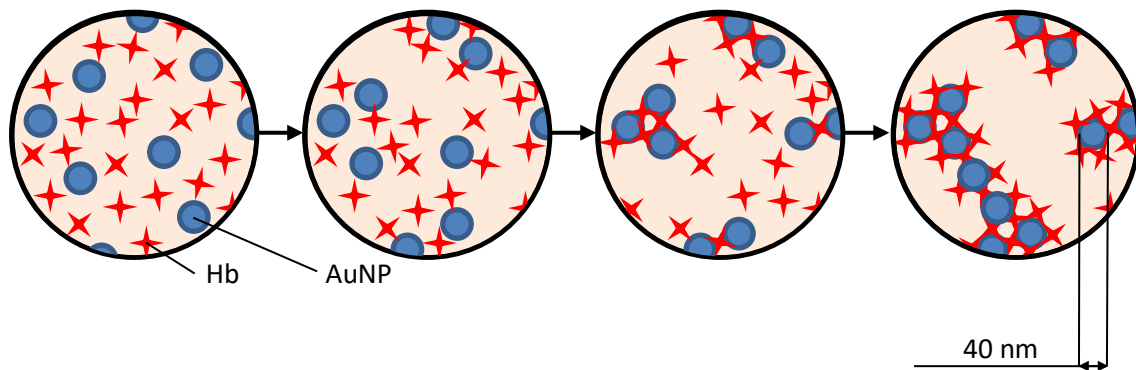
### **Antikörper und Hämoglobin als Auslöser für die Aggregation**

Neben der AuNP-Suspension und der Zugabe von DTNB und DTNB\* können weitere Faktoren wie die Funktionalisierung mit Antikörpern und Protein zu einer Aggregatbildung der AuNP führen und wurden bereits *in vitro* als Einflussfaktor für die Entstehung von Aggregaten beschrieben<sup>188,189</sup>. Proteinaggregation ist in vielen Bereichen biochemischer Prozesse von Bedeutung und kann zu weitreichenden Problemen in spezifischen Prozessabschnitten führen<sup>190</sup>. Chukalevski *et al.* fanden heraus, dass die Bildung von Aggregaten durch geringe und sehr hohe Proteinkonzentrationen begünstigt wird<sup>188</sup>. Da die verwendeten Konzentrationen an Antikörpern in einem eher geringen Konzentrationsbereich liegen, scheint dies die Bildung der bei den Raman-Mappings gesehenen Aggregate zu unterstützen. Allgemein besteht durch die Funktionalisierung der AuNP mit Antikörpern die Gefahr eines Aggregierens wie von Chukalevski *et al.* detailliert beschrieben wurde<sup>188</sup>.

Besonders die Funktionalisierung mit IgG-Antikörpern hat sich als einer der ausschlaggebenden Gründe für die Aggregation herausgestellt. Es wird zudem beschrieben, dass die Aggregation gegenläufig zu der Antikörperkonzentration ist, somit erzeugt eine geringe Konzentration große Aggregate und große Konzentrationen kleinere<sup>188</sup>. Die Antikörper wirken untereinander vernetzend und führen so zu einem Zusammenschluss der AuNP miteinander. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Funktionalisierung der AuNP zu der beobachteten Aggregation der AuNP zu großen Teilen beiträgt.

Die Antikörper fungieren dabei als eine Protein-Brücke zwischen den einzelnen AuNP und können diese so untereinander vernetzen, was zu der Bildung von großen Aggregaten führen kann. Besonders die Zugabe von dem am häufigsten vorkommenden Antikörper-Typ IgG, der dem verwendeten anti-Hämoglobin-Antikörper entspricht, scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Aggregatbildung der AuNP zu haben<sup>188,191</sup>. Weiterhin wird beschrieben, dass AuNP dazu neigen, eine nicht messbare Partikelaggregation im nanoskaligen Bereich zu induzieren. Möglicherweise konnten diese Mikroaggregate durch die geringe Größe bei der jeweiligen Überprüfung mit UV/Vis nicht bemerkt werden<sup>188</sup>. Einen weiteren kritischen Punkt stellt das Zentrifugieren der Partikel dar. Durch das Zentrifugieren werden die AuNP zu einem kleinen Pellet verdichtet und können so durch die auf sie einwirkende Kraft und die Nähe zueinander potenzielle Antikörper-Antikörper-Bindungen bilden. Diese Problematik ist ebenfalls bei der Zentrifugation der nicht funktionalisierten Partikel und der AuNP mit TNB und TNB\* zu beachten. Deshalb wurde explizit darauf geachtet, dass die entstandenen AuNP-Pellets, nach jedem Waschschrift vollständig durch wiederholtes Aufsaugen mit der Pipette resuspendiert wurden. Pellets, die nicht wieder resuspendiert werden konnten, wurden verworfen, da dies auf ein Ausfallen der AuNP hindeutete.

Ein weiterer als sehr kritisch zu betrachtender Schritt, während der Herstellung des Immunoassays ist die Funktionalisierung mit Hämoglobin, welche wie die Antikörper zu einer Aggregation der AuNP führen kann. Besonders für das Beispiel der Aggregation von AuNP durch die Zugabe von Hämoglobin wurde dies bereits in der Literatur diskutiert<sup>192</sup>. Moerz *et al.* beschrieben, dass die Aggregation besonders begünstigt wird, wenn die Hämoglobin-Konzentration in einem Bereich von 0,3 mg/mL und 10,0 mg/mL liegt. Unterhalb und oberhalb dieser Konzentrationen tritt eine geringer ausfallende Aggregation auf<sup>192</sup>. Das Schema der Aggregation von AuNP mit einem Durchmesser von ~ 40 nm mit immobilisiertem Hämoglobin ist in Abbildung 39 dargestellt.



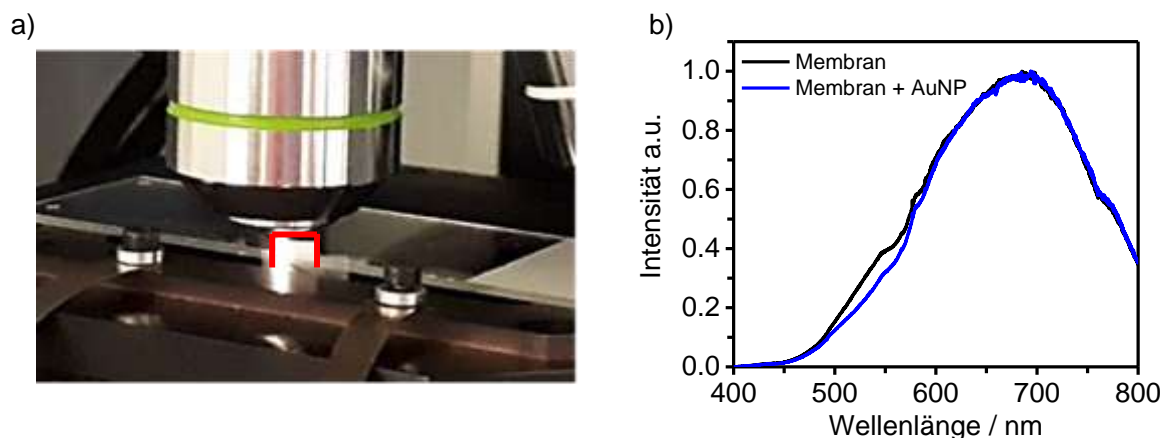
**Abbildung 39:** Entstehung von AuNP-Aggregaten durch die Zugabe von Hämoglobin. Beispielhafte Darstellung der Entstehung von Protein-bedingten Aggregaten bei 40 nm AuNP. Hämoglobin stellt einen Initiator der Partikelaggregation dar. Abbildung in Anlehnung an <sup>192</sup>.

Da die für diese Versuche gewählte und eingesetzte Konzentration innerhalb des von Moerz *et al.* beschriebenen kritischen Bereichs ist, liegt es nahe, dass dies eine Aggregation der AuNP begünstigt<sup>192</sup>. Problematisch ist dies besonders dann, wenn von einer Probe mit unbekannter Hämoglobinkonzentration ausgegangen wird. Diese Ansätze wären durch die hohen Konzentrationen an Hämoglobin, die in vielen Realproben vorhanden sein können, kritisch zu betrachten, da sie in den meisten Fällen zu einem Ausfallen der AuNP führen würden. Ebenso würde eine niedrig konzentrierte Probe eines anderen Biomarkers beispielsweise zu einer Aggregation führen. Die Entstehung von Aggregaten in den Ausgangslösungen für den SERS-Immunoassay kann somit nicht vollständig vermieden werden. Dies bedeutet, dass jeder Funktionalisierungsschritt der AuNP einen Einfluss auf die Aggregation der Partikel hat und sich somit nachteilig auf die Stabilität und Auswertbarkeit des Immunoassays auswirkt. In einer weiteren Studie haben Wang *et al.* Partikelaggregationen durch die Bindung von mit Antikörpern funktionalisierten AuNP und einem als Linker fungierenden Zielprotein genutzt, um für SERS-Messungen geeignete große Partikelkomplexe zu erzielen<sup>193</sup>. Dies verdeutlicht erneut den Einfluss der Aggregation der AuNP. In der Literatur ist die Problematik der Aggregatbildung bei der Verwendung von AuNP noch nicht ausreichend diskutiert. Dies ist darin begründet, dass bei den meisten auf SERS basierenden Immunoassays keine ID angewendet wird. Durch die Anwendung des Prinzips der ID wird diese Problematik besonders offensichtlich. Bei einem herkömmlichen SERS-Immunoassay wird dies einfach nicht bemerkt.

### Querschnittsmessung der Membranen

Auf Grund der REM-Aufnahmen wurde angenommen, dass ein Teil der AuNP tiefer in die Membran eindringt als zuvor vermutet, wodurch sie für Messungen, die in einer anderen Fokusebene der Membran durchgeführt werden, nicht detektierbar sind und für das Erzielen eines ausreichenden SERS-Signals fehlen.

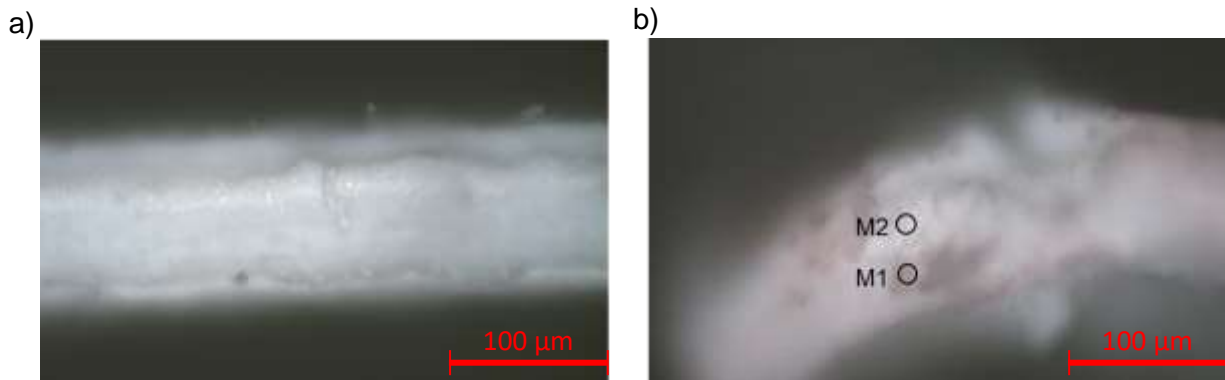
Auch mit den Messungen in den unterschiedlichen Tiefen der Membran konnten keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der Eindringtiefe und Lokalisation der AuNP erzielt werden (siehe Abbildung 33). Zudem konnten damit die bei den Mappings bemerkten Aggregate auf der Membran nicht gesehen werden, weshalb in einem weiteren Schritt ein Profil einer durchgeschnittenen Membran einen genaueren Einblick über die Lokalisation der AuNP und die Aggregate geben sollte. Es könnte somit überprüft werden, wie tief die AuNP in die Struktur der Membran eingedrungen sind. Die Raman-Mikroskopie ist für solche Untersuchungen die Methode der Wahl, um strukturell unterschiedliche und heterogene Systeme auf der Mikrometer- oder Nanometer-Ebene untersuchen zu können. Dabei wird der Laser auf ein kleines Volumen fokussiert. Die Apertur des Mikroskops verbessert zudem die laterale und axiale räumliche Auflösung des Mikroskops und ermöglicht so die Erstellung eines „Querschnittsprofils“ der untersuchten Proben<sup>182–184,194</sup>. Dazu wurde der Ansatz der Mikroreflexion des Raman-Spektrometers genutzt. Für die Erstellung solch einer Messung des Querschnitts wurde eine mit AuNP funktionalisierte Membran in der Mitte durchtrennt und vertikal auf einem Objektivträger befestigt, sodass es möglich war mit dem Laser auf den Querschnitt zu treffen (siehe Abbildung 40a). Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde ebenfalls eine nicht funktionalisierte Membran gemessen. Somit ist es möglich die Annahme zu bestätigen, dass die AuNP auch innerhalb der funktionalisierten Membran zu finden sind. Abbildung 40b zeigt, dass sich die Membran mit den immobilisierten AuNP von der unbehandelten Membran unterscheidet. Dieser Unterschied ist im Bereich von ca. 530 nm zu erkennen, welcher dem Absorptionsmaximum der immobilisierten und funktionalisierten AuNP entspricht.



**Abbildung 40:** Aufnahmen von Mikroreflexionsmessungen. Abbildung a) zeigt die Messung auf dem Querschnitt der Membran, die an einem Objektivträger befestigt ist; b) zeigt den Vergleich der Messungen einer nicht funktionalisierten Membran (schwarz) und einer mit AuNP-Funktionalisierung (blau). Die Reflexionsmessungen wurden mit 20facher Vergrößerung durchgeführt.

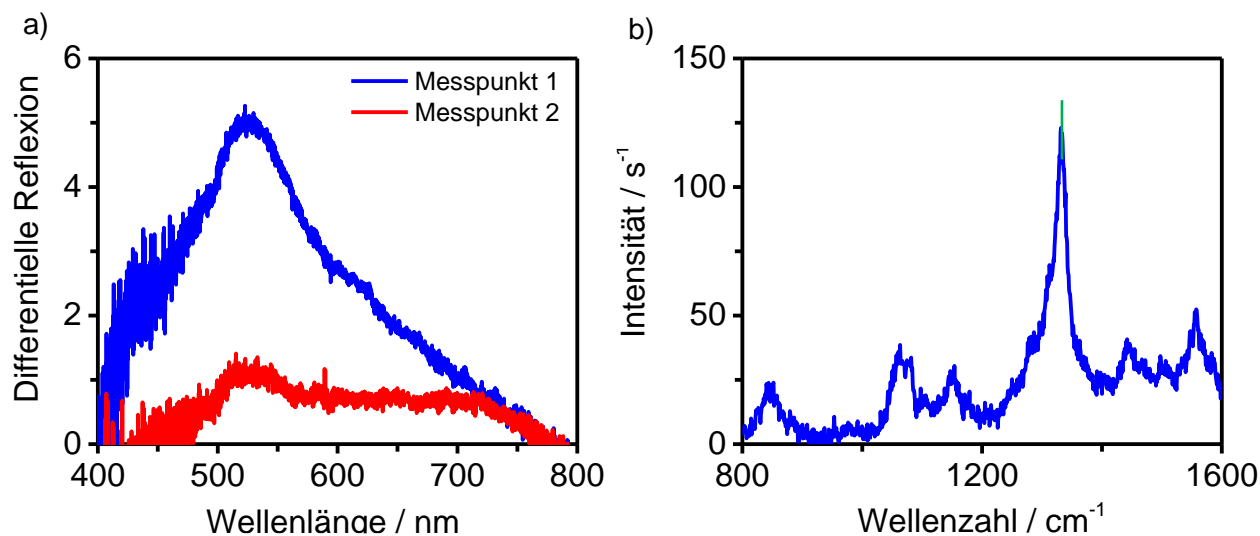
Der Unterschied der funktionalisierten Membran zu der nicht funktionalisierten wurde als weiterer Nachweis gewertet, dass sich AuNP auch innerhalb der Membran befinden. Dies unterstützt die zuvor gewonnenen Erkenntnisse der REM-Aufnahmen, dass ein gewisser Teil der AuNP innerhalb der Membran gefunden wird. Zusätzlich kann untersucht werden, ob die zuvor bemerkte Aggregatbildung auf der Membran ebenfalls innerhalb der Cellulosenitrat-Membran abgebildet werden kann.

Die Mikroskop-Aufnahmen auf der Oberfläche der Membran zeigten keine Aggregate, diese wurden erst bei den Raman-Mappings der Oberfläche deutlich. Bei einem genauen Vergleich der beiden Mikroskop-Aufnahmen der Membranen, (siehe Abbildung 41) fällt zunächst der deutliche Farbunterschied auf. Die nicht funktionalisierte Membran (Abbildung 41a) erscheint weiß, wohingegen die funktionalisierte Membran eine deutliche Rotfärbung aufweist, (Abbildung 41b).



**Abbildung 41:** Darstellung der Querschnitte der Cellulosenitrat-Membran mit einem Porendurchmesser von  $0,2\ \mu\text{m}$ ; a) Zeigt eine nicht funktionalisierte Membran und b) eine Membran mit immobilisierten AuNP-Komplexen. Die AuNP sind weit in die Membran eingedrungen. Die Membran weist durch die AuNP unterschiedlich gefärbte Stellen auf. Messpunkte mit M1 und M2 markiert.

Bei einer genaueren Betrachtung der Membranen fällt weiterhin auf, dass die funktionalisierte Membran unterschiedlich stark gefärbt ist, was auf eine unterschiedlich starke Migration der AuNP-Komplexe in die Membran hindeutet oder auf Partikelaggregate zurückzuführen sein kann. Aus diesem Grund wurden für die Messungen für die nicht modifizierte Membran ein und für die funktionalisierte Membran zwei Messpunkte ausgesucht, die in Abbildung 41b mit M1 und M2 gekennzeichnet sind. Als Messpunkte wurden dazu jeweils ein Punkt in einem sehr rot gefärbten Bereich ausgewählt, gekennzeichnet mit M1 und ein weiterer in einem weniger gefärbten Bereich, gekennzeichnet mit M2. Die schwierig einzustellende Schärfe der Oberflächen resultiert aus der unebenen Struktur der Membran. Bei der Untersuchung des Querschnitts wird die differentielle Reflexion gegen die Wellenlänge aufgetragen und man erhält eine Aussage über die auf der Membran befindlichen AuNP. Bei einer Umrechnung der in Abbildung 41 erhaltenen Daten, mit Hilfe von Formel 3.2, erhält man die differentielle Reflexion der Messungen der verschiedenen Messpunkte, wie in Abbildung 42 dargestellt.



**Abbildung 42:** a) Vergleich der Mikroreflexion im UV/Vis-Bereich innerhalb der Membran. Gemessen wurden an den Stellen M1 und M2. M1 befindet sich im Querschnitt unterhalb von M1 und weist eine stärkere Reflexion auf als M2; b) zeigt SERS-Messungen mit einem eindeutigen TNB-Signal (grün markiert) bei ca. 1330 cm<sup>-1</sup>.

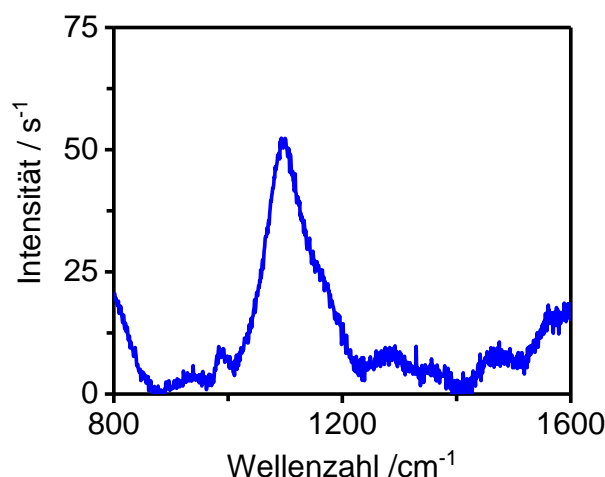
Es zeigt sich deutlich eine verminderte Reflexion bei ca. 530 nm, was dem Absorptionsmaximum der funktionalisierten AuNP entspricht. Ferner konnte mit diesen Messungen gezeigt werden, dass sich auf dem dunkleren Messpunkt, M1 im Vergleich zu M2, mehr AuNP innerhalb der Membran befinden als auf dem helleren M2, da eine stärkere differentielle Reflexion zu verzeichnen ist. Die Ergebnisse decken sich mit den Erwartungen einer ungleichmäßigen Verteilung der AuNP auf und innerhalb der Cellulosenitrat-Membran. Die Unterschiede zwischen M1 und M2 sind sehr auffällig, jedoch ließ die Eignung der Membran, in Bezug auf die Fokussierung und der Auswahl geeigneter Messpunkte keine statistische Auswertung zu. Nachdem die AuNP innerhalb der Membran nachgewiesen waren, wurde ebenfalls getestet, ob sich an dem Messpunkt M2 ebenfalls ein SERS-Signal erzeugt lässt, welches in Abbildung 42b zu sehen ist. Die SERS-Messung zeigt, dass ein eindeutiges TNB-Spektrum mit einer charakteristischen Bande der Streckschwingung bei 1330 cm<sup>-1</sup> erzeugt werden kann. Zudem fällt auf, dass die Eigenbanden der Membran bei ca. 853 cm<sup>-1</sup>, 1285 cm<sup>-1</sup> und 1375 cm<sup>-1</sup> nicht vorhanden sind. Resümierend lässt sich sagen, dass diese Untersuchung zusätzlich unterstreicht, dass Cellulosenitrat-Membranen mit einer Porengröße von 0,2 µm keine optimale Oberfläche für den Aufbau eines SERS-Immunoassays darstellen. Möglicherweise könnte eine Cellulosenitrat-Membran mit einem kleineren Porendurchmesser das Problem der AuNP-Migration in die Membran verringern. Dadurch könnten mehr AuNP auf der Oberfläche verbleiben und dort zu einem ausreichenden SERS-Signal führen. Jedoch bestünde noch das Problem der „Verzerrung“ der Mischungsverhältnisse zwischen den mit TNB und TNB\* funktionalisierten AuNP. Aus diesen Gründen wurde nach einer Alternative zu der verwendeten Membran gesucht. Als eine mögliche Alternative sind in der Literatur silanisierte Glaswafer beschrieben, deren Verwendung in den folgenden Kapiteln genauer dargestellt wird.



## 4.7 Glaswafer als Substrat für den Immunoassay

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die verwendete Cellulosenitrat-Membran kein geeignetes Material für einen ID-SERS-Immunoassay darstellt, wurde nach einem weiteren Material als Oberfläche gesucht. Aus diesem Grund wurden silanisierte Glaswafer als eine mögliche Alternative getestet.

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass die Verwendung des membranbasierten Testformats nicht geeignet ist für die Erstellung eines SERS-Immunoassays. Zusätzlich konnte die Aggregation der AuNP auf den Membranen nicht verhindert werden, was zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Ergebnisse führte. Die Erstellung einer Messreihe war so nicht möglich. Weiterführend erschien es sinnvoll ein alternatives Substrat als mögliche Oberfläche für den Immunoassay zu testen. Für das Erzielen eines funktionierenden Immunoassays wurde bei der Auswahl des neuen Materials darauf geachtet, dass dieses keine inhomogene Oberflächenstruktur aufweist und ebenso eine gute Immobilisierung des polyklonalen Antikörpers ermöglicht. Ebenso wichtig war es bei der Auswahl eines Materials zu beachten, ob es ähnlich störende Faktoren wie eine starke Aufladung oder Eigenbanden der Oberfläche gibt, wie sie bei dem Cellulosenitrat-membranbasierten Aufbau beobachtet wurden. In der Literatur finden sich einige SERS-Immunoassays, die auf silanisierten Glaswafern etabliert wurden und zunächst geeignet für das verfolgte Testformat erschienen<sup>195,196</sup>. Besonders im Bereich biologischer Messverfahren hat es in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen Anwendungen basierend auf beschichteten Glas- oder Siliziumwafern gegeben<sup>197</sup>. Aus diesem Grund fiel die Auswahl auf Glaswafer, die mit einem Aminoalkylsilan beschichtet sind. Diese sollten eine gute Eignung für die weitere Funktionalisierung mit Antikörpern bieten. Vor der Verwendung der Wafer wurden diese mittels Raman-Messungen getestet (siehe Abbildung 43), ob sie ähnlich störende Eigenbanden aufweisen wie die Cellulosenitrat-Membranen oder ob diese ausgeschlossen werden können.



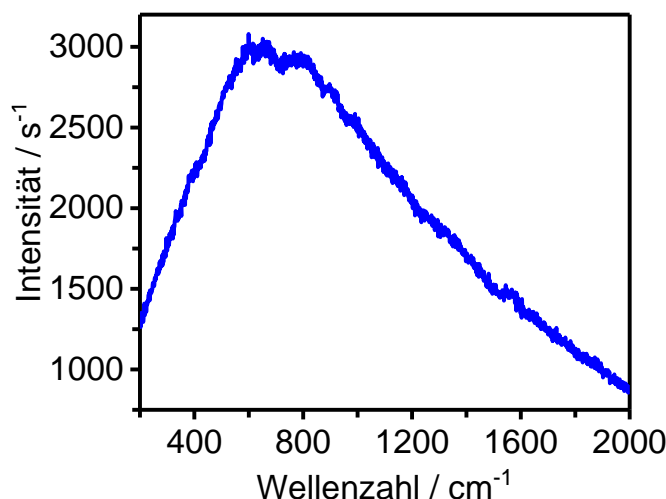
**Abbildung 43:** Raman-Messung eines nicht funktionalisierten Glaswafers. Es ist eine Bande bei 1100 cm<sup>-1</sup> zu erkennen. Diese stellt für die SERS-Messungen bei 1330 cm<sup>-1</sup> keine Beeinflussung dar.

Die Raman-Messung eines aminoalkyl-silanisierten Glaswafers zeigt keine Bande im Bereich der Wellenzahlen von TNB und TNB\* (bei ca. 1330 cm<sup>-1</sup>), sodass ein störender Einfluss bei den Messungen durch die Oberfläche ausgeschlossen werden konnte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Verwendung der Wafer das Erstellen des Immunoassays ermöglichte. Das Protein (der polyklonale Antikörper wurde mittels EDC/NHS-Aktivierung über Amidbindungen nach einem Protokoll von Maurer<sup>118</sup> an die Aminoalkylgruppen auf dem Wafer gebunden. Obwohl EDC/NHS im durchgeführten Antikörper-Experiment versehentlich zu den aminoalkyl-funktionalisierten Glaswafern gegeben wurde, ist es vermutlich bei Zugabe des Proteins zu einer nachträglichen Aktivierung der COOH-Gruppen der Antikörper gekommen, so dass es dennoch zu einer Bindung auf der Oberfläche gekommen ist. Eine weitere Möglichkeit der Bindung der Antikörper auf den Wafern kann eine Physisorption dieser auf der Wafer-Oberfläche sein. In beiden Fällen handelt es sich um eine ungerichtete Bindung, was bedeutet, dass die Orientierung und damit die Anzahl der aktiven Antikörper auf jedem Wafer unterschiedlich sein kann<sup>103</sup>.

### Nachweis der Immobilisierung von Antikörpern auf den Glaswafern

Während der Verwendung der Cellulosenitrat-Membranen konnte keine Überprüfung der Immobilisierung des polyklonalen Antikörpers auf der Oberfläche erfolgen. Im Gegensatz zu der herkömmlichen Detektion bei einem Sandwich-Immunoassay wird mit einem sekundären Antikörper gearbeitet, der mit HRP als Reporterenzym konjugiert ist. Dieses sorgt beispielsweise bei Western Blots durch die Oxidation eines zugesetzten Substrats für das Entstehen eines farbigen oder lumineszierenden Endproduktes, welches letztendlich gemessen werden kann<sup>198</sup>.

Da vorher kein Nachweis der Immobilisierung der Antikörper auf der Oberfläche der Cellulosenitrat-Membranen erfolgen konnte, wurde dies jetzt für die Glaswafer mit einem anderen Antikörper getestet, der nur der Visualisierung der Antikörper auf den Glaswafern dienen sollte. Ein Alexa Fluor® 633 mouse IgG Antikörper wurde als „Test-Antikörper“ verwendet, um die Immobilisierung der polyklonalen, gegen Hämoglobin gerichteten Antikörper auf den Glaswafern zu überprüfen. Das Ergebnis der Funktionalisierung ist in Abbildung 44 dargestellt.



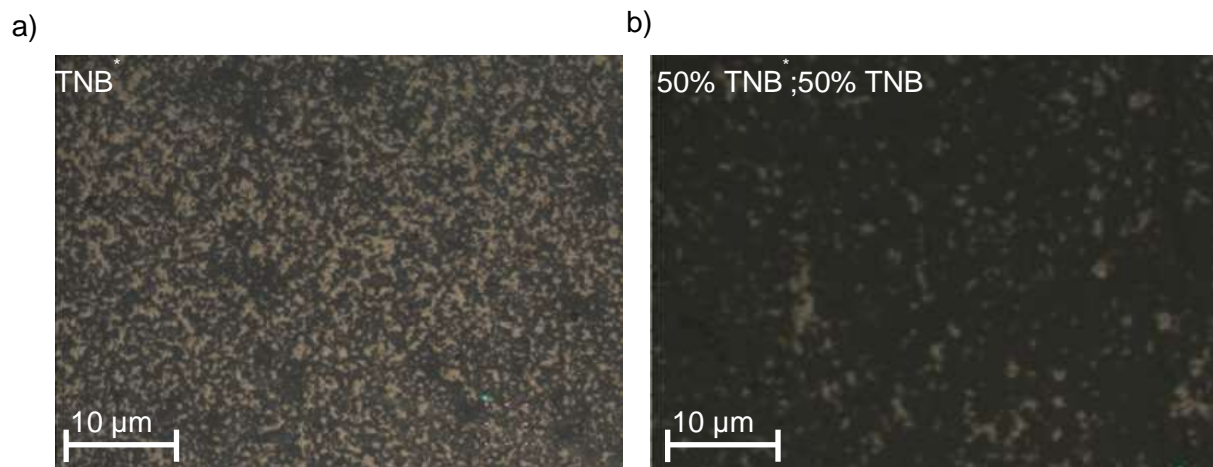
**Abbildung 44:** Raman-Messung des Alexa Fluor® 633 Antikörpers. Die Detektion erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm. Es konnte so nachgewiesen werden, dass die Immobilisierung der Antikörper durch EDC/NHS Kopplung erfolgreich war.

Das erhaltene Spektrum mit einem Maximum der Emission bei 633 nm bestätigt die erfolgreiche Funktionalisierung. Der als Test-Antikörper dienende Fluorophor-markierte Antikörper, hat gezeigt, dass solche Antikörper auf den silanisierten Glaswafern immobilisiert werden können. Dadurch ließen sich Rückschlüsse ziehen, dass der anti-Hämoglobin-Antikörper ebenso auf den Glaswafern immobilisiert werden kann.

### **Nachweis der Immobilisierung der funktionalisierten AuNP und Erstellung einer Messreihe auf den Glaswafern**

Nach dem erfolgreichen Test der Oberflächenfunktionalisierung der Glaswafer wurden die funktionalisierten AuNP (+ TNB oder TNB\*, + Antikörper, + Hämoglobin) auf diesen immobilisiert. Die Glaswafern wurden dafür zuerst mit den polyklonalen anti-Hämoglobin-Antikörpern funktionalisiert. Dabei erfolgte die Immobilisierung der AuNP-Komplexe analog zu der auf der Membran (siehe Kapitel 4.6). Dazu wurden die 11 Mischungsverhältnisse, der funktionalisierten AuNP auf den Wafern immobilisiert. Nach der Immobilisierung wiesen die Wafer eine rötliche Färbung auf, die auf die Immobilisierung der AuNP schließen ließ. Da die Wafer gleichbehandelt bzw. hergestellt

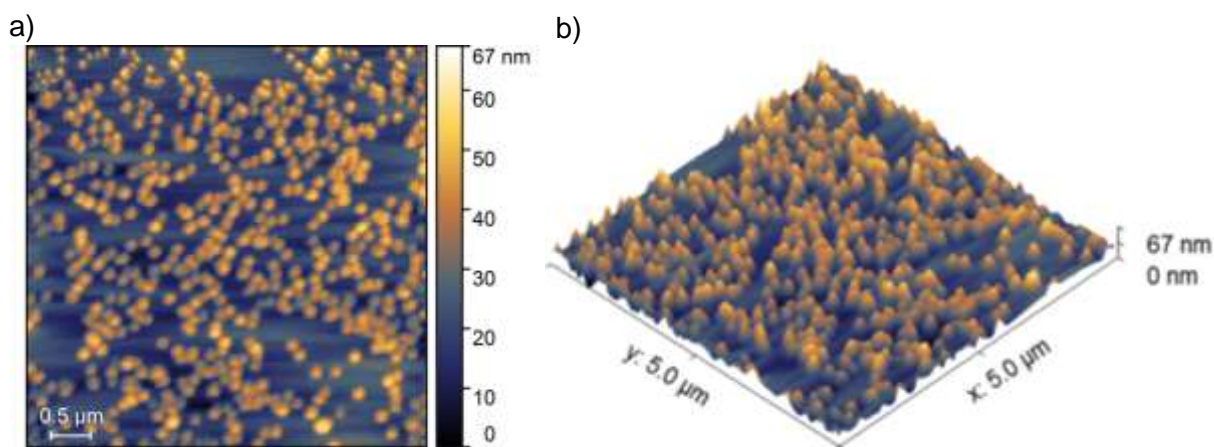
wurden, ist eine ähnliche Beladung der Oberflächen zu erwarten. Dies wurde mittels Mikroskopie der Oberfläche überprüft, wie in Abbildung 45 dargestellt. Zur Veranschaulichung sind zwei Oberflächen, mit TNB\* und mit 50% TNB/50% TNB\* beschichteten AuNP, gezeigt.



**Abbildung 45:** Mikroskop-Aufnahmen von zwei mit AuNP funktionalisierten Glaswafern. a) Zeigt einen Wafer mit TNB\* funktionalisierten AuNP; b) zeigt einen Wafer, der mit einer Mischung aus 50% TNB und 50% TNB\* funktionalisierten AuNP beladen wurde. Der Wafer mit TNB\* funktionalisierten Partikeln zeigt eine deutlich höhere Beladung mit AuNP.

Bei der Betrachtung der funktionalisierten Wafer fällt zunächst auf, dass die immobilisierten AuNP deutlich zu sehen sind und eine unterschiedliche Beladung mit AuNP vorliegt. Der Wafer mit TNB\* funktionalisierten AuNP (siehe Abbildung 45a) zeigt wesentlich mehr immobilisierte AuNP als der mit dem Mischungsverhältnis von 50% TNB und 50% TNB\* funktionalisierten AuNP (siehe Abbildung 45b). Ursache für diese unterschiedliche Beladung kann das Entstehen von Aggregaten, wie sie auch in Abbildung 45 gesehen werden können, während der Herstellung der AuNP-Lösungen sein. Diese Aggregate können dazu führen, dass unterschiedlich viele AuNP auf der funktionalisierten Oberfläche haften bleiben. Anschließend wurden die funktionalisierten Glaswafer mittels AFM (Atomic Force Microscopy) untersucht, um weitere Erkenntnisse über die Oberflächentopologie zu erhalten. AFM zählt, neben optischen-, elektrochemischen- und Elektronenmikroskop-basierten Methoden, zu den am meisten verwendeten Techniken, um eine Charakterisierung von Nanopartikeln durchzuführen und bietet sich zudem besonders für die Visualisierung von Oberflächentopologien an. Zudem ist es eines der wenigen bildgebenden Verfahren, das eine Betrachtung von Biokonjugaten ohne weitere Modifizierung mit einem spezifischen Marker erlaubt<sup>199</sup>. Nanopartikel und andere Strukturen können mittels AFM im Gegensatz zu den bereits gezeigten Mikroskop-Aufnahmen in drei Dimensionen dargestellt werden. Auf einem geeigneten Substrat, den Glaswafern, immobilisiert können so einzelne Partikel näher untersucht werden<sup>200</sup>. Ergebnisse dieser Methoden unterscheiden sich häufig aufgrund unterschiedlicher Störungen während der Messungen. Störende Einflüsse für die AFM-Messungen und daraus resultierend die Charakterisierung der AuNP können die Rauigkeit des verwendeten Substrats sowie die Beschaffenheit der verwendeten Spitze sein, welche die Charakterisierung der AuNP

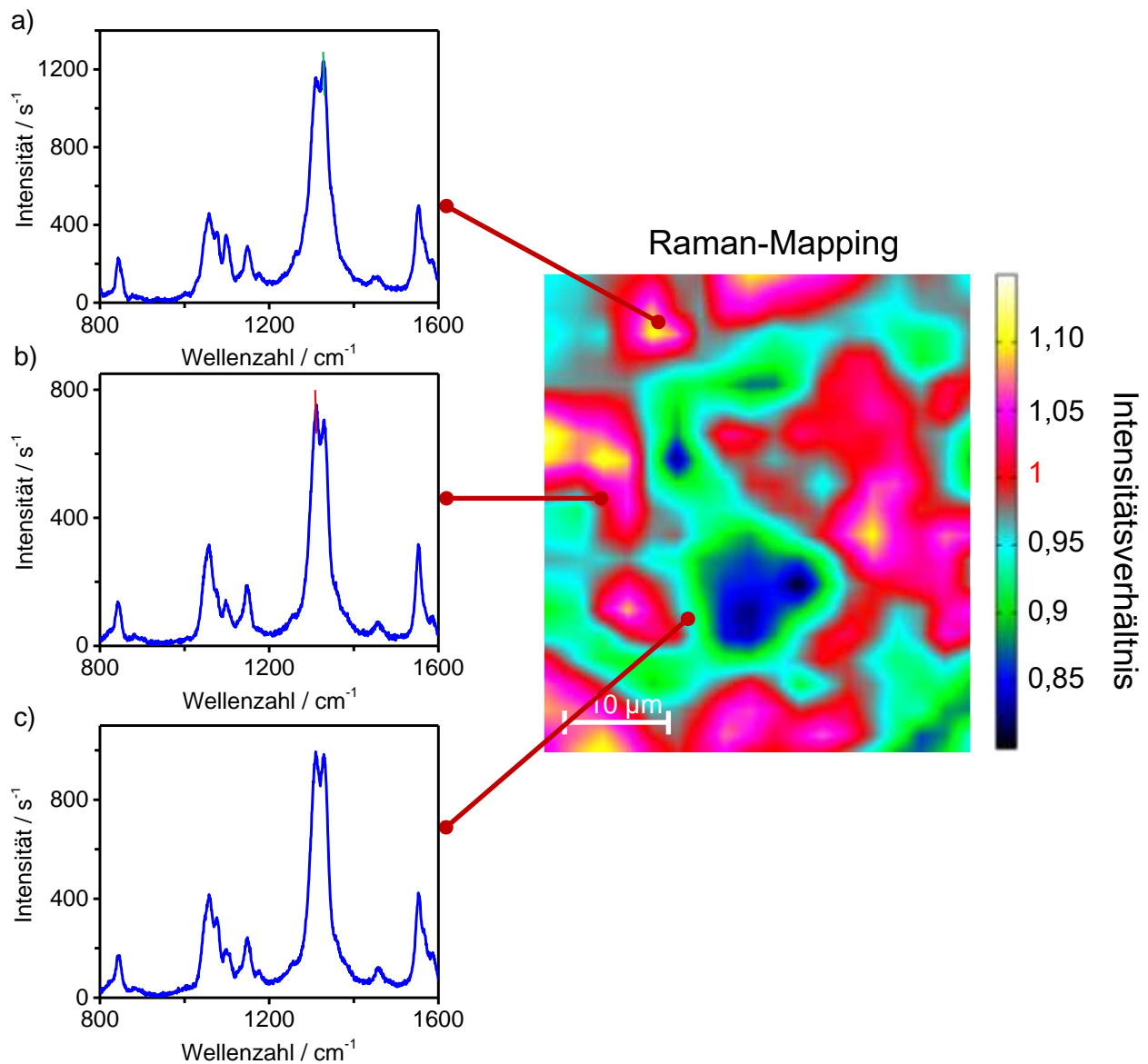
beeinflussen können<sup>201</sup>. Die AFM-Aufnahmen, in Abbildung 46 zeigen eine mit AuNP inhomogen beladene Oberfläche der Wafer.



**Abbildung 46:** Oberflächentopologie eines mit AuNP funktionalisierten Glaswafers; a) Zeigt die Größenverteilung der gemessenen AuNP; b) stellt die Topologie der immobilisierten AuNP dar und zeigt eine hohe Partikelkonzentration sowie vereinzelte Aggregate.

Eine genauere Betrachtung der AuNP zeigt, dass sie in langen kettenartig verknüpften Strukturen oder Aggregaten vorliegen. Bemerkte wurde dieses Verhalten der Partikel bereits bei den REM-Messungen auf der Membran. Auffällig ist die inhomogene Verteilung auf der Oberfläche, wodurch nicht mit Partikeln beladene Areale entstehen. Die bestimmbare Größe der Partikel liegt mit ca. 60 nm oberhalb des erwarteten Größenbereichs von 40 nm und kann durch verschiedene Messeinflüsse begründet werden. Dies kann u.a. an dem Einfluss der Messspitze liegen, die die Sphärizität der AuNP nicht optimal abbilden kann. Die AFM Spitze kann nicht die unteren, auf dem Wafer aufliegende Rundung der Nanopartikel erfassen und misst daher größere AuNP. Weiterhin wird die Messgenauigkeit beeinflusst, wenn mehrere Schichten AuNP senkrecht aufeinander liegen, wodurch der Cantilever, der die Probe misst sehr viel früher auf eine höhere Messposition gebracht wird und dadurch vermeintlich größere AuNP misst. An anderen Stellen, sind neben vereinzelt auftretenden AuNP auch Dimere zu erkennen. Diese Dimere weisen einen sehr geringen Abstand von wenigen Nanometern zueinander auf, welcher auf die Funktionalisierung mit organischen Schichten hindeuten kann. Die helleren Stellen deuten auf eine Erhöhung des Profils hin und damit verbunden die AuNP-Aggregate. Die AuNP liegen somit nicht in einer homogenen Monolage auf dem Wafer auf, sondern in mehreren Schichten in der Z-Ebene<sup>202</sup>. Insgesamt kommt es durch diese beschriebenen Einflüsse zu einer Verzerrung der abgebildeten Größen und die AuNP werden vergrößert dargestellt. Eine Bestimmung der AuNP Anzahl auf den Wafern ist aufgrund der Ausbildung von mehreren Lagen Partikel nicht möglich. Nach der erfolgreichen Immobilisierung und dem Nachweis der AuNP auf den Wafern wurde geprüft, ob es möglich ist, verbesserte SERS-Spektren, die die vorgegebenen Verhältnisse von mit TNB und TNB\* funktionalisierten AuNP korrekt abbilden, zu erhalten. Da sich bei den Membranen bereits herausgestellt hatte, dass es zielführender ist, Mappings durchzuführen, wurde dies beibehalten.

Die Mappings wurden auf einem Wafer mit mit einem Mischungsverhältnis von 50% TNB und 50% TNB\* funktionalisierten AuNP durchgeführt. Dieses Mischungsverhältnis hatte sich als besonders geeignete Testmischung bei dem membranbasierten Testformat herausgestellt und sollte nun als erstes überprüft werden, wie in Abbildung 47 gezeigt ist.

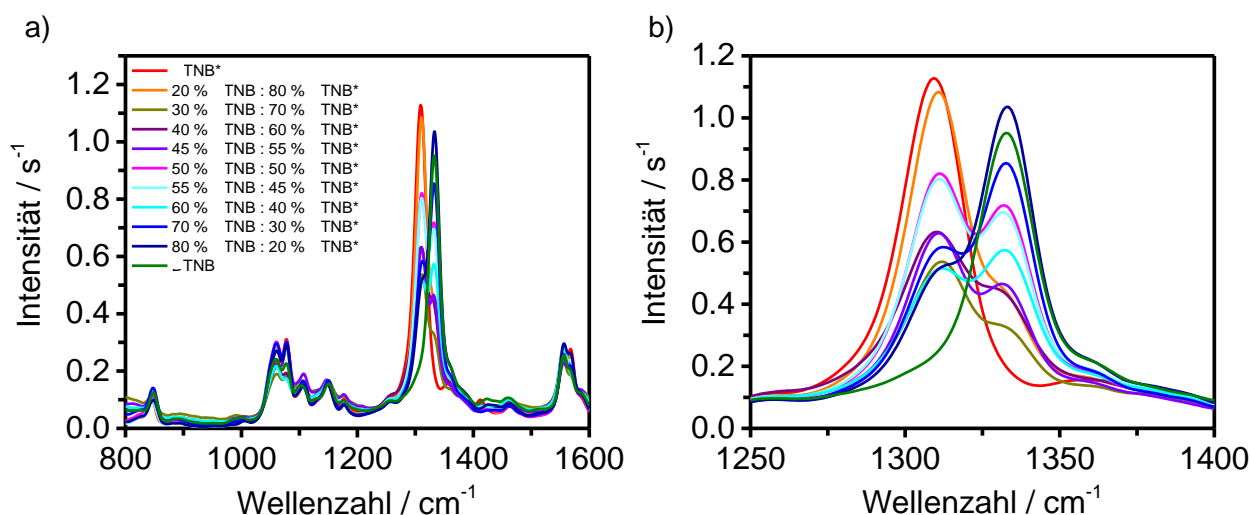


**Abbildung 47:** Darstellung eines Raman-Mappings mit drei Einzelspektren. Die durch das Mapping entstandene Vielzahl an Spektren gibt einen Überblick über die auf den Glaswafern immobilisierten AuNP. Die Einzelspektren zeigen ein geringfügig unterschiedliches Mischungsverhältnis. Die Spektren a) und b) zeigen einen leicht überwiegenden Anteil von TNB (grün markiert) oder TNB\* (rot markiert) das Spektrum c) zeigt ein optimales Verhältnis der Mischung 50% TNB; 50% TNB\*.

Das Raman-Mapping eines Wafers mit mit einem Mischungsverhältnis von 50% TNB und 50% TNB\* funktionalisierten AuNP zeigt wie auf der Membran Schwankungen der Intensitätsverhältnisse, jedoch sind diese deutlich geringer ausgeprägt. Dies deutet erneut darauf hin, dass die Problematik der Aggregation der AuNP gegeben ist und aus Aggregaten von jeweils TNB oder TNB\* funktionalisierten Partikeln resultiert, die in den Mischungsverhältnissen durch die Ausgangslösungen vorhanden sind. Diese Aggregate werden dann mit den Mischungsverhältnissen auf der Oberfläche immobilisiert.



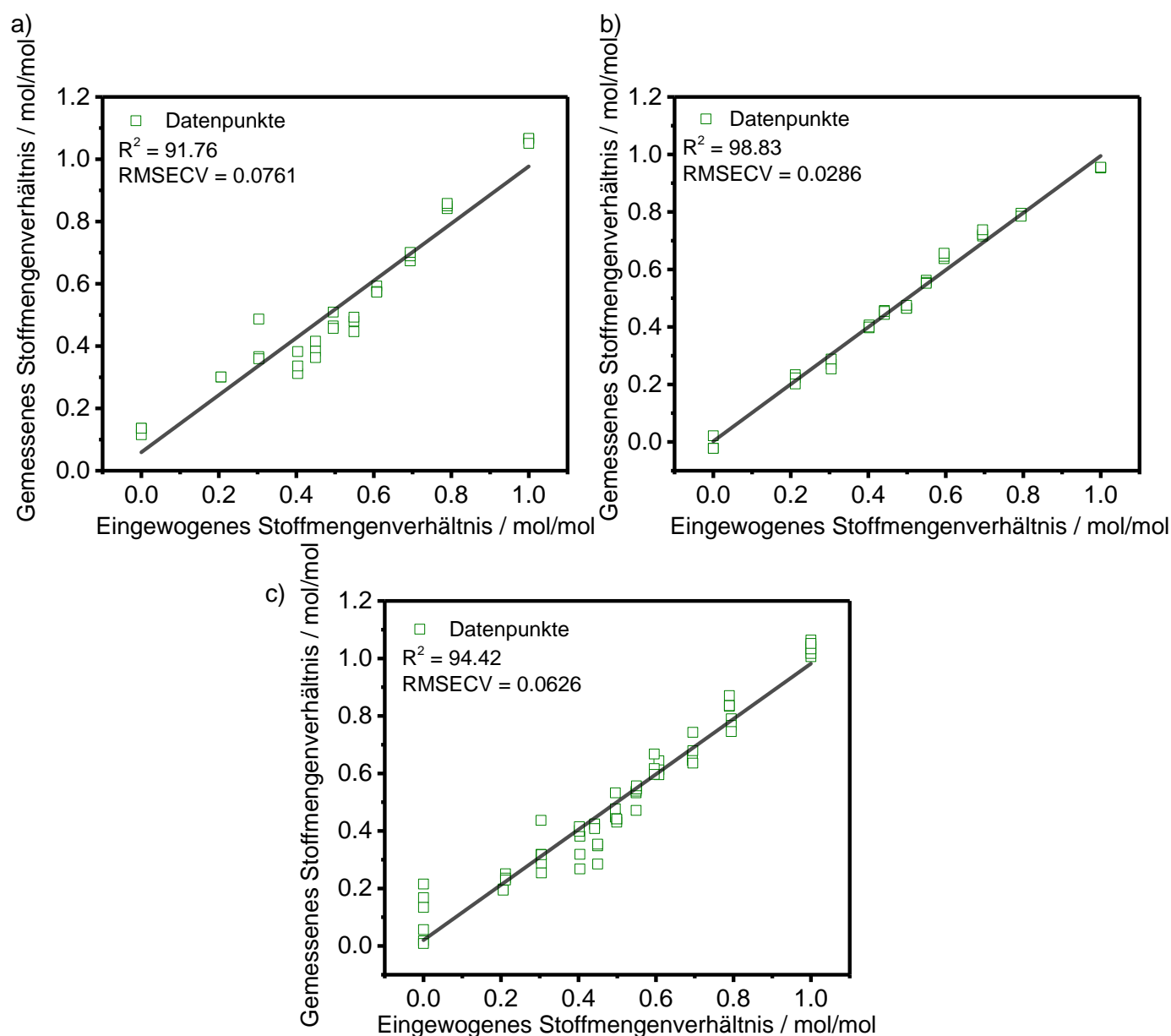
Die Mappings zeigen, dass die Verteilungen der Mischungsverhältnisse auf den Oberflächen immer noch inhomogen sind und sich stellenweise eine Verschiebung der Verhältnisse zeigt, wobei diese wesentlich geringer ausfällt als bei dem membranbasierten Testformat. Daher wurde eine Messreihe mit den 11 Ansätzen in den TNB/TNB\*-Mischungsverhältnissen von 100:0 bis 0:100 (siehe Seite 131) erstellt und gemessen. Die einzelnen Ansätze wurden als Duplikate hergestellt und jeweils dreimal gemessen. Die Ergebnisse der ersten Messreihe mit 11 Spektren sind in Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 48:** SERS-Spektren mit 11 verschiedenen Mischungsverhältnissen von mit TNB und TNB\* funktionalisierter AuNP. Die Spektren stellen eine Mittelung des jeweiligen Mischungsverhältnisses eines Mappings dar. Abbildung a) zeigt alle Mischungsverhältnisse beginnend von 100% DTNB\* bis zu 0%. Die Spektren wurden auf die Bande bei 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  normiert und eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Aus Gründen der Übersicht sind nur 11 Spektren dargestellt. Abbildung b) zeigt eine Vergrößerung der für die Auswertung relevanten Banden von TNB und TNB\*. Eine genaue Abstufung der Verhältnisse ist nicht zu erkennen. Sie können nicht genau den tatsächlichen Verhältnissen zugeordnet werden.

Die SERS-Spektren spiegeln die Mischungsverhältnisse nur bedingt wider. Die Spektren zeigen erneut Abweichungen vom Sollwert, nicht nur bei den prominenten TNB und TNB\*-Banden, sondern auch bei den Banden im Bereich von 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$  und bei 1550  $\text{cm}^{-1}$ . Die Schwankungen beziehen sich dabei auf die Resultate der Mischungsverhältnisse. Ein Spektrum spiegelt daher nicht exakt die TNB und TNB\*-Verhältnisse wider, die durch die Mischungsverhältnisse erzielt werden sollten. Dies zeigte sich bei dem Vergleichsmodell in Suspension nicht und deutet auf generelle Schwierigkeiten des Testformats hin. Bei dem Vergleichsmodell in Suspension, wurde jedoch keine weitere Funktionalisierung der AuNP mit Antikörpern und Hämoglobin durchgeführt. Die Ergebnisse der Glaswafer-basierten Messungen ermöglichen jedoch im Gegensatz zu dem membranbasierten Testformat eine weitere Auswertung der erhaltenen Spektren.

Aus den erhaltenen Spektren, die in zwei Messreihen mit je 11 Mischungsansätzen gemessen wurden, konnte eine erste Auswertung erreicht werden, welche in Abbildung 49 zu sehen ist.

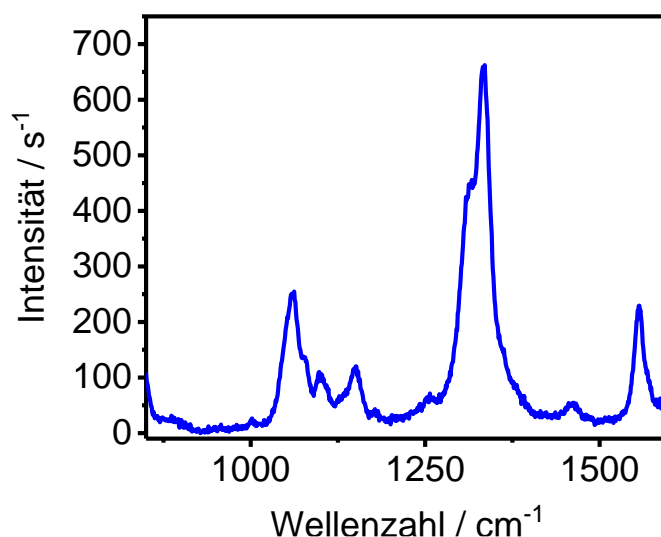


**Abbildung 49:** Testformat auf den Glaswafern mit insgesamt 66 in die Auswertung eingeflossene Spektren. Abbildung a) und b) stellen die beiden tagesunabhängigen Messreihen dar. Es wird deutlich, dass sie mit  $R^2$  von 91,76 und 98,83 eine unterschiedliche Qualität zeigen. Dies zeigt sich auch in dem RMSECV der bei Messreihe a) zudem hoch ist. Die Auswertung beider Messreihen von a und b ist in c dargestellt und zeigt ein  $R^2$  von 94,42.

Die Herstellung der Kalibrieransätze erfolgte analog zu dem Modell auf der Cellulosenitrat-Membran gemäß metrologischen Richtlinien und es mussten aus Gründen der Rückführbarkeit an mehreren Stellen des Protokolls die benötigten Mengen gravimetrisch bestimmt werden, um mittels des PLS-Modells eine möglichst hohe Genauigkeit zu erreichen. Aus den Berechnungen der Spektren und der eingewogenen Mengen der mit TNB/TNB\* funktionalisierten AuNP resultiert die in Abbildung 49c zu



sehende Mess- bzw. Kalibrierreihe. Bei diesem Ansatz wurden im Gegensatz zu dem Testformat der AuNP-Suspensionen nur zwei tagesunabhängige Ansätze erstellt und gemessen. Dies ist auf die längere Probenherstellung und Durchführung der Messungen zurückzuführen, soll aber an dieser Stelle ausreichen, um zu testen, wie genau das vorliegende Testformat ist. Zudem war davon auszugehen, dass auch ein dritter Ansatz abweichenden Spektren zeigen wird. Betrachtet man die beiden Messreihen einzeln, Abbildung 49a und b, fallen bereits Unterschiede auf. Die Auswertung der ersten Messreihe auf den silanisierten Glaswafern zeigt, ein Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 91,76, während die zweite Messreihe mit 98,83 eine wesentlich geringere Fehlerabweichung aufweist. Dies spiegelt sich auch im RMSECV (root mean square error of cross validation) wider und zeigt, dass die zweite Messreihe genauer ist und eine bessere Bandenlage sowie eine bessere Abbildung der Mischungsverhältnisse zeigt. Der direkte Vergleich der Messreihe zeigt an dieser Stelle sehr gut, dass die Güte und Qualität der Messungen sehr stark von dem jeweiligen Ansatz abhängt und die in den vorherigen Kapiteln erörterten Probleme zu einer erhöhten Unsicherheit des Kalibriermodells beitragen. Die Auswertung des gesamten Ansatzes, aller gemessenen Spektren, zeigt ein  $R^2$  von 94,42 welches zwischen den beiden einzelnen Ansätzen liegt und damit keine ausreichende Genauigkeit für eine weitere Quantifizierung von Hämoglobin bietet. Eine weiterführende Validierung des Testformats konnte an dieser Stelle noch nicht erfolgen, da dies die Behebung der vorher dargestellten Problematiken innerhalb des ID-SERS-Immunoassays erfordert. Zusätzlich wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Bei dieser Art der Kontrollmessung ist das zu erwartende Ergebnis negativ und verifiziert, dass keine oder nur wenige unspezifische Bindungen vorliegen, die einen Einfluss auf das Ergebnis haben können<sup>203</sup>. Für die Durchführung solch einer Kontrollmessung, wird ein essenzieller Parameter, meist das Zielprotein, weggelassen. In dieser Messung wurde dazu Hämoglobin bei einer Komponente eines Mischungsverhältnisses nicht an die AuNP gebunden. Als geeignetstes Mischungsverhältnis für den Test schien 50% TNB;50% TNB\* zu sein. Da sich ein Mischungsverhältnis von 1:1 auf den Glaswafern als annähernd gleich herausgestellt hat, können Unterschiede, die durch das Wegfallen des Hämoglobins entstehen können, am ehesten bemerkt werden. Ein Wafer wurde mit einem Ansatz aus 50% TNB und 50% TNB\* inkubiert, jedoch wurden nur die AuNP des TNB\*-Ansatzes mit Hämoglobin funktionalisiert. Die AuNP mit TNB wurden hingegen nur mit Antikörper funktionalisiert. Die 1:1 Mischung wurde auf einen Wafer immobilisiert. Das resultierende SERS-Spektrum ist in Abbildung 50 zu sehen.



**Abbildung 50:** SERS-Kontrollmessungen eines 50% TNB und 50% TNB\* Mischungsverhältnisses. Nur der Ansatz mit TNB\* ist mit Antikörper und Hämoglobin funktionalisiert, der Ansatz mit TNB ist nur mit Antikörpern funktionalisiert. Die Bande bei 1330  $\text{cm}^{-1}$  stellt die mit TNB funktionalisierten AuNP dar.

Entgegen der Erwartung weist die Kontrolle ein umgekehrtes Verhältnis auf. Die Komponente (AuNP + DTNB, + Antikörper), die nicht mit Hämoglobin funktionalisiert wurde, zeigt eine bessere Signalintensität als die Komponente mit Hämoglobin (AuNP + DTNB\*, + Antikörper, + Hämoglobin). Es sollte lediglich der Anteil, der mit Hämoglobin funktionalisiert wurde, auf der Oberfläche immobilisiert werden. Dies zeigt, dass in der Kontrollmessung die unspezifischen Bindungen überwiegen. Die Antikörper auf den Glaswafern interagieren mit den freien Antikörpern auf den AuNP. Dieses Ergebnis unterstützt auch die vorher getroffene Annahme der Aggregation der AuNP durch die Funktionalisierung mit Antikörper. Eine Blockierung der Oberfläche konnte aus Zeitgründen nicht mehr getestet werden, kann aber den Vorteil einer Verminderung von unspezifischen Bindungen führen sofern diese durch Areale, die nicht mit Antikörper besetzt sind, verursacht werden.

Die Erstellung des Immunoassays auf den Wafern hat gezeigt, dass das Testformat nur bedingt geeignet ist für eine weitere Quantifizierung von Hämoglobin. Die bei dem Membranmodell bemerkten Probleme einer Aggregation der Partikel können auf den Wafern ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Zudem zeigt die Negativ-Kontrolle die Detektion unspezifischer Bindungen. Aus diesen Gründen besteht der Bedarf an weiteren Versuchen, die ein unproblematisches Messen der auf den Glaswafern immobilisierten Mischungsverhältnisse ermöglichen. Daraus resultierend könnte weiterführend eine Quantifizierung von Hämoglobin gelingen.

## 4.8 Messunsicherheiten in komplexen biologischen Systemen

Die Bestimmung der Messunsicherheit bei biologischen oder biochemischen Fragestellungen bekommt, wie in dieser Arbeit dargestellt einen immer größeren Stellenwert in der Forschung und der Gesellschaft, wodurch der Bedarf an zuverlässigen Methoden zur genauen Bestimmung von Biomarkern entsteht. Die Metrologie rückt dabei in den Fokus. Gerade bei der Verwendung von biologischen Proben, zeigen sich die Schwierigkeiten bei der Anwendung metrologischer Lösungsansätze. Eine Bestimmung von Messunsicherheitsbudgets ist in der Metrologie essenziell, um eine Aussage über die Güte und Genauigkeit eines Systems treffen zu können. Dabei ist die Betrachtung der Messunsicherheiten stark von der jeweiligen Methode abhängig. So können beispielsweise die Unsicherheiten von komplexen Systemen und Quantensystemen unter Betrachtung der einfließenden Größen betrachtet und bestimmt werden. Vor allem stellen sich bei dieser Betrachtung Systeme als schwierig dar, die viele Freiheitsgrade besitzen und auf Nanosystemen mit multiparametrischen Abhängigkeiten basieren. Diese Systeme werden in kleinere Systeme heruntergebrochen, die zwischen systematischen und statistischen Einflüssen unterscheiden<sup>204</sup>.

Gerade bei der Betrachtung von biologischen Nanosystemen ist es schwierig diese Unterteilung zu treffen, da häufig keine klare Trennung der einzelnen Komponenten des jeweiligen Systems möglich ist. Diese Problematik ergibt sich aus der Komplexität biologischer Strukturen und der verwendeten Matrices<sup>205</sup>. Durch die Verwendung von Proteinen und Antikörpern und die damit verbundene Probenmatrix ist es schwieriger, die vielen beeinflussenden Parameter und deren Unsicherheit genau zu bestimmen<sup>1</sup>. Zu den einfließenden Faktoren, die die Qualität bioanalytischer Methoden beeinflussen, sind biologische Moleküle als analytische Tools zu zählen. Deren Stabilität und Spezifität machen einen großen Teil der jeweiligen Anwendung aus. So kann beispielsweise die Proteinkonzentration von Hämoglobin bestimmt werden, aber die Aktivität der Antikörper oder deren Avidität nur sehr schwer. Zusätzlich sind diese Proben meist mit einer nicht bestimmbarer Ausfallquote bzw. Unsicherheit behaftet, die in die Testmethode einfließen. Betrachtet man allein die Antikörper, können diese von Herstellungsprozess zu Herstellungsprozess in ihre Qualität unterschiedlich sein, was eine ständige Kontrolle für die Eignung in dem vorliegenden System bedeutet. Weitere Beeinflussungen durch Puffer und pH-Werte, die zu einer veränderten Konformation und Verhalten der Proteine bzw. Antikörper führen können, sind ebenfalls zu diskutieren. Die AuNP stellen ebenfalls einen großen Einflussfaktor des Modells dar, wie sich in der Arbeit deutlich gezeigt hat. Obwohl sie und ihre Funktionalisierung gut charakterisiert sind, können sie dennoch Aggregate bilden oder sich anders verhalten als erwartet und so zu einer Beeinflussung des SERS-Signals führen. Das verwendete Substrat hatte einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis des Immunoassays dargestellt. Dies geht ebenfalls in die Auswertung mit ein, kann jedoch nicht genau in seiner Auswirkung bestimmt werden. Insgesamt stellen diese Faktoren und deren Unsicherheiten erhebliche Einflussfaktoren dar, die mehr in der Literatur diskutiert werden

müssen. In der Wissenschaft muss daher eine Herangehensweise gefunden werden, um mit diesen Unsicherheiten in biologischen Systemen verantwortungsvoll umzugehen<sup>206,207</sup>.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Kombination der Isotopenverdünnung mit der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie besitzt das Potenzial einer SI-rückführbaren Methode für die Bestimmung der Konzentration von Hämoglobin oder anderen Biomarkern. Eine die praktischen Anforderungen erfüllende Methode konnte jedoch noch nicht realisiert werden. Die Funktionsweise des ID-SERS-Immunoassays basiert auf einer indirekten Detektion von Hämoglobin durch den ramanaktiven Marker 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) in nativer und isotopolog angereicherter Form (DTNB\*). Das höhere molekulare Gewicht des DTNB\* führt zu einer Verschiebung von charakteristischen Banden bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  innerhalb der Raman-Spektren hin zu der kleineren Wellenzahl und so zu einem Raman-shift, welcher für die Realisierung der ID genutzt wird. Die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie basiert auf der Verwendung von nanostrukturierten Oberflächen oder Nanopartikeln. Diese erzeugen bei einem geringen Abstand von ca. 2 nm zueinander den Effekt der Oberflächenverstärkung (surface enhancement). Für die Realisierung dieses Effekts wurden daher AuNP (40 nm, von BBI solutions) ausgewählt. Zudem bilden die AuNP eine gute Ausgangsbasis für weitere Funktionalisierungen. Hämoglobin ist einer der am häufigsten getesteten Biomarker und es besteht der Bedarf einer SI-rückführbaren Methode für die Konzentrationsbestimmung, welche durch den ID-SERS-Immunoassay gegeben wäre. Ferner könnte dieses Testformat, durch den Austausch der verwendeten Antikörper auch für andere Analyten eingesetzt werden. Dies ist besonders von Vorteil, da nicht jeder Analyt isotoopenangereichert vorliegen muss, sondern durch die indirekte Isotopenmarkierung mit TNB bestimmt werden kann. Das als Referenz dienende Hämoglobin, mit einer bekannten Konzentration, sollte dazu über einen spezifischen Antikörper an mit TNB\* funktionalisierte Goldnanopartikel (TNB\*-AuNP) gekoppelt werden. Analog sollte das Hämoglobin mit einer unbekannten Konzentration an die mit nativem TNB funktionalisierte AuNP gebunden werden. Die Bindung der Antikörper erfolgte über Physisorption. Die TNB-AuNP und TNB\*-AuNP-Lösungen wurden dann in definierten Mengen für die SERS-Messungen gemischt. Mit Hilfe der Intensitätsverhältnisse der Nitrobanden, von TNB und TNB\* welche auf den AuNP funktionalisiert wurden, sollte dann das Verhältnis zwischen der Hämoglobin-Referenz und der Hämoglobin-Probe bestimmt werden und dadurch die unbekannte Konzentration der Probe ermittelt werden.

Die mit TNB oder TNB\* funktionalisierten AuNP wurden in weiteren Schritten jeweils mit einem monoklonalen anti-Hämoglobin-Antikörper und Hämoglobin funktionalisiert. Die Funktionalisierung der AuNP wurde nach den jeweiligen Schritten mit UV/Vis-Spektroskopie und Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei der UV/Vis-Spektroskopie zeigte sich eine Verschiebung der Absorptionsmaxima, was als Zunahme der Partikelradien und so als erfolgreiche Funktionalisierung gedeutet wurde. Dabei ließen sich für die Funktionalisierung mit TNB/TNB\* Verschiebungen der Absorptionsmaxima von ~2 nm, für die Funktionalisierung mit Antikörper von ~3 nm und für die Funktionalisierung mit Hämoglobin von ~4 nm verzeichnen. Die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese zeigten zusätzlich den Erfolg der Funktionalisierung, da die AuNP mit Funktionalisierung ein verändertes Laufverhalten aufwiesen. SAXS-Messungen hingegen konnten keine weiteren Erkenntnisse in Bezug auf die Funktionalisierung erbringen, da der Kontrast der Proteinschichten im Vergleich zu dem der AuNP mit 40 nm nicht ausreichend war. Die Bindungsfähigkeit der verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper gegenüber Hämoglobin wurde mittels SDS-PAGE, nativer PAGE und Dot-Blot-Verfahren erfolgreich überprüft. Besonders bei dem Dot-Blot-Verfahren zeigte sich, dass die getesteten anti-Hämoglobin-Antikörper das Hämoglobin noch in Konzentrationen von 0,01 mg/mL binden können. Zum Nachweis wurde, wie bei der SDS-PAGE und der nativen PAGE ein ECL-System zum visuellen Nachweis verwendet. Aus Gründen der Vereinfachung und Etablierung des Immunoassays wurde an dieser Stelle zunächst nur ein Hämoglobin mit bekannter Konzentration, anstatt eines zertifizierten Referenzmaterials verwendet.

Für die Erstellung des SERS-Immunoassays war es notwendig, die AuNP mit TNB (+ Antikörper, + Hämoglobin) und die mit TNB\* (+ Antikörper, + Hämoglobin) zu Mischungsverhältnissen zusammenzuführen. Diese Mischungsverhältnisse spiegeln unterschiedliche Anteile der Komponenten AuNP mit TNB oder AuNP mit TNB\* wider und dienen dazu, durch die verschiedenen Verhältnisse eine lineare Korrelation zu erhalten. So konnte aus 11 Mischungsverhältnissen eine Messreihe erstellt werden. Die funktionalisierten AuNP der Mischungsverhältnisse sollten auf einem geeigneten Material immobilisiert werden. Zuerst wurden Cellulosenitrat-Membranen mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm getestet. Die Immobilisierung der Mischungsverhältnisse erfolgte durch auf der Membran physisorbierte Antikörper. Es stellte sich heraus, dass die Membran aufgrund ihrer Porengröße und weiterer Eigenschaften der Oberfläche, ungeeignet war, da die AuNP in die Poren der Membran hineinwandern und ein Nachweis der Immobilisation bzw. das Erzeugen von TNB/TNB\*-Spektren dadurch erschwert bis unmöglich wurde. Eine Inkubation der gesamten Membran in einer Lösung mit polyklonalen Antikörpern ermöglichte zwar das Messen von charakteristischen TNB-Spektren, das vorgegebene Verhältnis, beispielsweise 1:1, der Mischungen von mit TNB und TNB\* (jeweils + Antikörper, + Hämoglobin) funktionalisierten AuNP wurde jedoch nicht wiedergegeben.

Auch mittels SERS-Mappings von ausgewählten Bereichen der Membran konnten die Messergebnisse nur unwesentlich verbessert werden. Trotz einer Mittelung der Spektren konnten keine ausreichenden

Daten für eine weitere Auswertung erzielt werden. Die mangelnde Wiedergabe der TNB/TNB\*-Verhältnisse in den gemessenen Spektren deutet auf das Vorliegen von Aggregaten in den jeweiligen AuNP-Lösungen (+ jeweilige Funktionalisierungen) hin, die auf die Membranen übertragen wurden. Als mögliche Ursache für die Aggregatbildung in den Partikel-Lösungen können die einzelnen Funktionalisierungsschritte gesehen werden, da besonders Antikörper und Hämoglobin zu einer Vernetzung führen können, wodurch die AuNP ebenfalls in diese einbezogen sind. Zusätzlich ist das Zentrifugieren der AuNP, um überschüssiges Material (DTNB, Antikörper) abzutrennen, kritisch zu sehen. Die Kräfte, die während der Zentrifugation, auf die AuNP in derselben Richtung wirken, können ein Aggregieren ebenfalls begünstigen. Da die Membran zusätzlich durch die markanten Eigenbanden, die in den Bereichen von TNB/TNB\* bei  $1285\text{ cm}^{-1}$  zu finden sind, und die Porengröße als nicht geeignet erschien, wurde eine weitere Möglichkeit eines geeigneten Materials für die Immobilisierung der AuNP-Mischungen getestet.

Alternativ wurden mit Aminopropylgruppen silanierte Glaswafer verwendet. Auf diesen Wafern wurde ebenfalls der polyklonale anti-Hämoglobin-Antikörper immobilisiert (siehe Seite 98), wie durch den Test mit einem Alexa Fluor® markierten Antikörper realisiert werden konnte. Zudem zeigen die silanierten Glaswafer keine Eigenbanden in den für TNB/TNB\* charakteristischen Bereichen von  $1330\text{ cm}^{-1}$ . Messungen von elf immobilisierten Mischungen unterschiedlicher Verhältnisse konnten durchgeführt werden. Die Spektren zeigten immer noch Abweichungen von den erwarteten Werten und Schwankungen der Bandenverhältnisse von TNB und TNB\*, jedoch fielen diese erheblich kleiner aus als bei den Messungen auf den Membranen.

Dies ermöglichte die Durchführung von zwei unabhängigen Messreihen, an unterschiedlichen Tagen. Die Messungen der Raman-Mappings, die pro Wafer durchgeführt wurden, wurden zu einem Spektrum gemittelt, welches in die Auswertung einfließt. Bei der Betrachtung der zwei Messreihen fallen Unterschiede in der Qualität der Daten auf. Die Messreihen weisen ein Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 91,76 und 98,83 auf. Die Berechnung des Testformats unter Einbeziehung aller gemessenen Spektren (insgesamt 66 Spektren) ergibt ein  $R^2$  von 94,42 und einen mittleren quadratischen Fehler von 0,0626, je kleiner dieser ist, desto zuverlässiger ist das entstandene PLS-Testformat. Es lässt sich somit für die Auswertung der Spektren auf den Glaswafern sagen, dass sie im direkten Vergleich zu den Membranmessungen erheblich besser sind, jedoch durch die Einflüsse der Partikelaggregation ebenfalls Schwankungen unterworfen sind, die zu einer Verschlechterung des Testformats beitragen. Für ein zufriedenstellendes Ergebnis des SERS-Immunoassays müssen weitere Veränderungen vorgenommen werden. Diese beziehen sich besonders auf den Einfluss der Partikelaggregation, welche in der Literatur noch nicht ausreichend diskutiert wurde. Deshalb kann der SERS-Immunoassay zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht als eine alternative SI-rückführbare Methode angesehen werden. Zusätzlich zu den angestrebten Veränderungen des ID-SERS Immunoassays, gibt es weitere Alternativen für ein Funktionieren der Methode. Zu diesen Möglichkeiten zählen mit Protein A oder G beschichtete

Wafer. Diese sind in der Literatur als ein Material beschrieben, mit dem es möglich sein soll, die Antikörper spezifisch auf der Oberfläche zu immobilisieren. Sowohl Protein A als auch Protein G weisen eine sehr starke Bindungsaffinität gegenüber den basalen Fc-Regionen der Antikörper auf. Bisher werden mit mit Protein A und G beschichteten Partikeln Immunopräzipitationen durchgeführt. Dadurch kann eine gerichtete Immobilisierung der Antikörper auf einer mit Protein A/G beschichteten Oberfläche erfolgen<sup>208,209</sup>. Die Verwendung dieser Wafer wäre ein weiterer Schritt in Richtung eines funktionierenden ID-SERS-Immunoassays und zu einer SI-rückführbaren Alternative zu den bisherigen Detektionsmöglichkeiten von Biomarkern und ganz besonders Hämoglobin.

## Literaturverzeichnis

1. Hashemi P, Luckau L, Mischnick P, Schmidt S, Stosch R, Wünsch B. Biomacromolecules as tools and objects in nanometrology—current challenges and perspectives. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409:5901-5909.
2. White GH. Metrological traceability in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem*. 2011;48(5):393-409.
3. Pessoa MCF, Ferreira Jr. OC. Metrological traceability in clinical laboratory. *J Bras Patol Med Lab*. 2016;52(3):157-164.
4. Milton MJT, Quinn TJ. Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia*. 2001;38:289-296.
5. Bundesärztekammer. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt*. 2014;111(Heft 38):1583-1618.
6. RfB. Referenzinstitut für Bioanalytik. Published online June 4, 2019. [https://www.rfb.bio/cgi/displayAnaStats?rv\\_type=all&rvTypeForDetails=OH&year=2017&rv\\_num=2&anlyte=all&searchType=rv\\_type&anaV=1](https://www.rfb.bio/cgi/displayAnaStats?rv_type=all&rvTypeForDetails=OH&year=2017&rv_num=2&anlyte=all&searchType=rv_type&anaV=1)
7. Referenzinstitut für Bioanalytik. RfB-Web-Manual - Ringversuche.
8. DIN 58931:2010-08 Hämatologie – Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut – Referenzmethode.
9. Zakel S, Wundrack S, O'Connor G, Güttler B, Stosch R. Validation of isotope dilution surfaceenhanced Raman scattering (IDSERS) as a higher order reference method for clinical measurands employing international comparison schemes. *J Raman Spectrosc*. 2013;(44):1246-1252.
10. Kahraman M, Mullen ER, Korkmaz A, Wachsmann-Hoglu S. Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing. *Nanophotonics*. 2017;6:22.
11. Gumustas A, Eryilmaz M, Sykut EA, Uslu B. Paper based lateral flow immunoassay for the enumeration of Escherichia coli in urine. *Anal Methods*. 2018;10:1213-1218.
12. Gellner M. Plasmonisch aktive Kern/Schale-Nanopartikel für die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie, Universität Osnabrück. Published online 2011.
13. Gellner M, Kömpe K, Schlücker S. Multiplexing with SERS labels using mixed SAMs of Raman reporter molecules. *Anal Bioanal Chem*. 2009;394:1839-1844.
14. Wang Y, Tang L-J, Jiang J-H. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based, Homogeneous, Multiplexed Immunoassay with Antibody-Fragments-Decorated Gold Nanoparticles. *Anal Chem*. 2013;85(19):9213–9220.
15. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005;51:2415-2418.



16. Lottspeich F, Engels J. *Bioanalytik*. 1248 (13-472) 3. Springer; 2012.
17. Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science*. 2006;2(3):217-235.
18. Rau S. – Vom Antikörper zum Immunoassay – Nachweis und Quantifizierung des nichtsteroidalen Antirheumatikums Diclofenac in relevanten Matrices, Universität Tübingen. Published online 2015.
19. BioRad. *ELISA Basics Guide*. Bio-Rad Laboratories; 2017.
20. Biorad. *ELISA - The Essentials*. Bio-Rad Laboratories; 2017.
21. Boster Antibody and ELISA Experts. *ELISA Handbook Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols*.
22. Lin C-C, Yang Y-M, Chen Y-F, Yang T-S, Chang H-C. A New Protein A Assay Based on Raman Reporter Labeled Immunogold Nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2008;24(2):178-183.
23. Abcam. Glossary. Antibody glossary. Published 2020. Accessed February 28, 2020. <https://www.abcam.com/protocols/glossary>
24. Mutneja M, Mohan C, Long K, Das C. *An Introduction to Antibodies and Their Applications*. Published online 2014.
25. Schnöller C. Induktion und Charakterisierung von Antikörpern gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV und Gammaretroviren, Universität Potsdam. Published online 2004.
26. Thies MJW. Struktur, Stabilität und Faltung von Antikörperdomänen, TU München. Published online 2002.
27. Urry L, Cain M, Wassermann S, Minorsky P, Reece J. *Campbell Biologie*. 11th ed. Pearson; 2019.
28. Heilmann K, Messerschmidt K, Holzlöhner P. Monoklonale Antikörper – Herstellung und Verwendung. *BIOspektrum*. 2012;18:167-169.
29. Kanai M. Entwicklung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von Domoinsäure, TU München. Published online 2002.
30. Siddiqui MZ. Monoclonal Antibodies as Diagnostics; an Appraisal. *Indian J Pharm Sci*. 2010;72:12-17.
31. Smekal A. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften*. 1923;11:873-875.
32. Raman CV, Krishnan KS. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. 1928;(121):501-502.
33. Landsberg GZ. A Hadrons and Nuclei. *Phys*. 1927;43:773-778.
34. Vortisch H. Beobachtung von Phasenübergängen in einzeln levitierten Schwefelsäuretröpfchen mittels Raman-Spektroskopie und elastischer Lichtstreuung, Freie Universität Berlin. Published online 2002.

35. Lovric M. Raman-Spektroskopie, Vorlesung, TU Dortmund. Published online 2007.
36. Selbach F. Synthese und Charakterisierung molekular verbrückter Edelmetall-Nanopartikel für die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie, Universität Duisburg Essen. Published online 2017.
37. Kühler P. Oberflächenverstärkte Spektroskopie mit plasmonisch gekoppelten Goldnanopartikeln, Ludwig Maximilians Universität. Published online 2015.
38. Sönnichsen C. Plasmons in metal nanostructures, Ludwig Maximilian Universität. Published online 2001.
39. Puschnig P. Atom-, Molekül- und Festkörperphysik: Molekülspektren, Normalkoordinaten, Franck-Condonprinzip, Phosphoreszenz. Presented at the: 2013.
40. Lehmann T. IR-Spektroskopie, Freie Universität Berlin. Published online 2010.
41. Weigel A, Schuh M. Raman-Spektroskopie. Published online 2017.
42. Fox T. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie IR- und UV-Spektroskopie. Presented at the: Universität Zürich.
43. Blázquez Sánchez D. The Surface Plasmon Resonance of Supported Noble Metal Nanoparticles: Characterization, Laser Tailoring, and SERS Application, Universität Kassel. Published online 2007.
44. Wünsch B. Fluoreszenz- und streuungsbasierte Einzelmolekülmikroskopie an DNA-Origami-Nanostrukturen, Technische Universität Braunschweig. Published online 2017.
45. Drude P. Zur Elektronentheorie der Metalle. *Annalen der Physik*. 1900;306:566-613.
46. Sommerfeld A, Bethe HA. *Elektronentheorie Der Metalle*. Springer; 1967.
47. Henkel C, Santer S. Nano-Optik und Plasmonik, Skript Dortmund. Published online 2014.
48. Topp K. Kolloidale Goldnanopartikel – Synthese, Charakterisierung und Wirkung in Polymer/Fulleren-Solarzellen, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg. Published online 2011.
49. Nordlander P, Oubre C, Prodan E, Li K, Stockmann MI. Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers. *Nano Letters*. 2004;4:899-903.
50. Romero I, Aizpurua J, Bryant GW, Garcia De Abajo FJ. Plasmons in nearly touching metallic nanoparticles: singular response in the limit of touching dimers. *Optics Express*. 2006;14:9988-9999.
51. Vosgröne T. Untersuchungen zum oberflächenverstärkten Raman-Effekt auf Einzelmolekülebene, Universität Siegen.
52. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett*. 1974;26:163-166.

53. Van Duyne RP, Jeanmaire DL. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J Electroanal Chem.* 1977;84:1-20.
54. Creighton JA, Albrecht MG. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. 1977;99:5215-5217.
55. Moskovits M, Suh JS. Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver. *J Phys Chem.* 1984;88:5526-5530.
56. Moskovits M. Conformation of mono- and dicarboxylic acids adsorbed on silver surfaces. *J Am Chem Soc.* 1985;107:6826-6829.
57. Moskovits M. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev Mod Phys.* 1985;57:783-826.
58. Le Ru E, Etchegoin P. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy.* Elsevier; 2009.
59. Brem S. Synthese von maßgeschneiderten thiolierten Raman-Farbstoffen für den Einsatz in der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie, Universität Duisburg Essen. Published online 2017.
60. McNay G, Eustace D, Smith WE. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. 2011;65:825-837.
61. Kazuma E, Jung J, Ueba H, Trenary M, Kim Y. Real-space and real-time observation of a plasmon-induced chemical reaction of a single molecule. *Science.* 2018;360:521-526.
62. Vogl J, Pritzkow W. Isotope Dilution Mass Spectrometry - A Primary Method of Measurement and Its Role for RM Certification. *MAPAN-Journal of Metrology Society of India.* 2010;25(No.3):135-164.
63. Vogl J, Pritzkow W. Isotope reference materials for present and future isotope research. *J Anal At Spectrom.* 2010;25:923-932.
64. Sargent M, Harrington C, Harte R. *GUIDELINES FOR ACHIEVING HIGH ACCURACY IN ISOTOPE DILUTION MASS SPECTROMETRY.* The Royal Society of Chemistry; 2002.
65. Arsene CG, Ohlendorf R, Burkitt W, et al. Protein Quantification by Isotope Dilution Mass Spectrometry of Proteolytic Fragments: Cleavage Rate and Accuracy. *Anal Chem.* 2008;80:4154-4160.
66. BIPM. Consultative Committee for Amount of Substances (CCQM). *Report of the 4th meeting.* Published online 1998.
67. Frank C, Brauckmann C, Palos M, et al. Comparison of potential higher order reference methods for total haemoglobin quantification—an interlaboratory study. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(9):2341-2351.
68. Zakel S, Rienitz O, Güttler B, Stosch R. Double isotope dilution surface-enhanced Raman scattering as a reference procedure for the quantification of biomarkers in human serum. 2011;136(136):3956-3961.
69. Blutspende SRK Schweiz AG. Das Blut Arbeitsheft. Published online 2013.

70. U.S. Department of Health. *Y o u r G u i d e t o Anemia*. Published online 2011.
71. Panawala L. What is the Structure of Hemoglobin in the Human Body. *IEPEDIAA*. Published online 2017:1-8.
72. Förster M. Wie entsteht der rote Blutfarbstoff Haemoglobin. Published 10 2019. Accessed March 5, 2020. <https://www.grossesblutbild.de/wie-entsteht-der-rote-blutfarbstoff-haemoglobin.html>
73. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc; 2006.
74. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *BLOOD*. 2008;112:3927-3938.
75. Hb-Wert. MedizInfo. Accessed December 10, 2019. [http://www.medizinfo.de/labormedizin/haematologie/hb\\_wert.shtml](http://www.medizinfo.de/labormedizin/haematologie/hb_wert.shtml)
76. Falz R, Busse M. Determination of hemoglobin mass in humans by measurement of CO uptake during inhalation of a CO-air mixture: a proof of concept study. *Physiol Rep*. 2018;6(17):1-11.
77. Davis BH, Jungerius B. International Council for Standardization in Haematology technical report 1-2009: new reference material for haemoglobinocyanide for use in standardization of blood haemoglobin measurements. *Int Jnl Lab Hem*. 2010;32:139-141.
78. Lewis SM. Quality Assurance In Haematology. *WHO/LAB*. Published online 1998:1-116.
79. SIGMA-ALDRICH. Product Information - Drapkin's Reagent. Published online 2015.
80. Srivastava T, Negandhi H, Neogi SB, Sharma J, Saxena R. Methods for Hemoglobin Estimation: A Review of "What Works". *J Hematol Transfus*. 2014;2(3):1-7.
81. Higgins C. Hemoglobin and its measurement. *acutearetesting.org*. Published online 2005:1-10.
82. Chakravarthy, VK, Chandra DN, Prasanna BS, Rao TJM, Rao DR. Haemoglobin Estimation by Non-cyanide Methods. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2012;6(6):955-958.
83. biorapid GmbH. Hämoglobin AHD/AHD 575. Published online 2014.
84. Parikh S, Parikh B, Bhansali P, Patel J, Joshi D. Haemoglobinometry by a Novel Alkaline Haematin Detergent-575 Method. 2010;65(1):14-19.
85. Hajian-Tilaki K. The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation. *Stat Methods Med Res*. 2018;27(8):2374-2383.
86. Vesper HW, Thienpont LM. Traceability in Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry*. 2009;55(6):1067-1075.
87. Barwick VJ, Prichard E. Eurachem Guide: Terminology in Analytical Measurement – Introduction to VIM 3. Published online 2011.
88. Food and griculture Organization of the United Nations. THINGS TO KNOW ABOUT THE RING TEST. Published online 2015.

89. Martín J, Velázquez N, Asuero AG. *Youden Two-Sample Method*. Vol 1 Kapitel 3. INTECH; 2017.
90. Knabbe C, Kohse KP, Neumaier M. Ringversuch für Hämatologische Bestimmungen HA4/19.
91. Knabbe C, Kohse KP, Neumaier M. Ringversuch für Hämoglobin-Derivate OH2/17.
92. ASTM. Standard Guide for Raman Shift Standards for Spectrometer Calibration. Published online October 10, 1996.
93. Berg RW, Nørbygaard T. Wavenumber Calibration of CCD Detector Raman Spectrometers Controlled by a Sinus Arm Drive. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2006;(41):165-183.
94. Neese F, Wennmohs F. ORCA- An abinitio, DFT and semiempirical SCF-MO package -Version 4.0.1 - RELEASE -. Published online 2017.
95. Capelle. A Bird's-Eye View of Density-Functional Theory. Published online 2006.
96. Finocchi F. Density Functional Theory for Beginners - Basic Principles and Practical Approaches. Published online 2011.
97. Bügel S. Density Functional Theory in Practice.
98. Xue Y, Li X, Li H, Zhang W. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. *NATURE COMMUNICATIONS*. 2014;5:1-9.
99. BBI solutions. EM.GC40-40nm Gold Data Sheet. Published online February 28, 2019. Accessed February 28, 2019. <https://www.bbisolutions.com/en/product/gold-colloid-40nm-20ml>
100. Lehmann T. UV/VIS-Spektroskopie. Published online 2009.
101. Analytik Jena. Grundlagen Instrumentation und Techniken der UV VIS Spektroskopie. <https://files.vogel.de/vogelonline/vogelonline/files/3810.pdf>
102. Thermo scientific. INSTRUCTIONS: Easy-Titer IgG Assay Kits. Published online April 1, 2019.
103. Saha B, Evers TH, Prins MWJ. How Antibody Surface Coverage on Nanoparticles Determines the Activity and Kinetics of Antigen Capturing for Biosensing. *Anal Chem*. 2014;86(16):8158–8166.
104. Magdeldin S. *GEL ELECTROPHORESIS – PRINCIPLES AND BASICS*. 1st ed. INTECH; 2012.
105. AppliChem. Agarose-Gel-Elektrophorese. Published online 2009. Accessed February 27, 2019. <https://docplayer.org/15773173-Agarose-gel-elektrophorese.html>
106. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012;62:1-5.
107. Schnablegger H, Singh Y. *The SAXS Guide Getting Acquainted with the Principles*. Anton Paar GmbH; 2013.
108. Krumrey M, Garcia-Diez R, Gollwitzer C, Langner S. Größenbestimmung von Nanopartikeln mit Röntgenkleinwinkelstrahlung. *Sonderdruck aus PTB-Mitteilungen*. 124:2014.

109. Sakurai S. SAXS Evaluation of Size Distribution for Nanoparticles. In: *X-Ray Scattering*. Vol 1. IntechOpen; 2017.
110. Erickson HP. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online*. 2009;11(Number 1).
111. Agbiaka A, Wiltfong M, Park C. Small Angle X-Ray Scattering Technique for the Particle Size Distribution of Nonporous Nanoparticles. *Journal of Nanoparticles*. 2013;2013:1-11.
112. Tian X, Langkilde AE, Thorolfsson M, Rasmussen HB, Vestergaard B. Small-Angle X-ray Scattering Screening Complements Conventional Biophysical Analysis: Comparative Structural and Biophysical Analysis of Monoclonal Antibodies IgG1, IgG2, and IgG4. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(6):1701-1710.
113. BBI solutions. EM.GC40-40nm Gold Data Sheet. Accessed February 28, 2019. [https://www.bbisolutions.com/eu/amfile/file/download/file\\_id/11/product\\_id/3/](https://www.bbisolutions.com/eu/amfile/file/download/file_id/11/product_id/3/)
114. Nobbmann U, Connah M, Fish B, et al. Dynamic Light Scattering as a Relative Tool for Assessing the Molecular Integrity and Stability of monoclonal Antibodies. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2007;24(1):117-128.
115. Vöros J. The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. *Biophysical Journal*. 2004;87(1):553-561.
116. Schermeyer M-T, Wöll AK, Kokke B, Eppink M, Hubbuch J. Characterization of highly concentrated antibody solution - A toolbox for the description of protein long-term solution stability. 2017;9(No.7):1169-1185.
117. G-Biosciences. Dot Blot Analysis Teacher's Guidebook. Published online 2012.
118. Maurer V. Herstellung eines Hybridsystems aus Gold- und Eisenoxidnanopartikeln zur Detektion und Quantifizierung von Tau-Protein, Technische Universität Braunschweig. Published online 2018.
119. Prats-Mateu B, Gierlinger N. Tip in–light on: Advantages, challenges, and applications of combining AFM and Raman microscopy on biological samples. *Microscopy Research and Technique*. 2017;80:30-40.
120. WITec. WITec alpha300 Series Modular Confocal Raman Microscopy Systems.
121. WITec. Atomic Force Microscopes.
122. Roth A. Multivariate Analyse von MIR-Spektren zur quantitativen Untersuchung von Fruchtsäften. Published online 2016.
123. Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. Ellman's Reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid)- a Reexamination. *Analytical Biochemistry*. 1979;94:75-81.
124. Ellman GL. A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*. 1958;74(2):443-450.
125. Ellman GL. Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959;82:70-77.

126. 5,5'-DITHIO-BIS(2-NITROBENZOIC ACID) Product Information.  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8130?lang=de&region=DE>. Published January 3, 2019. Accessed January 3, 2018.  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8130?lang=de&region=DE>
127. Landino LM, Mall CB, Nicklay JJ, Dutcher SK, Moynihan KL. Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, by the biologically relevant oxidants peroxynitrite anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *NIH Public Access*. 2008;1(18):11-18.
128. Zengin A, Tamer U, Caykara T. A SERS-Based Sandwich Assay for Ultrasensitive and Selective Detection of Alzheimer's Tau Protein. *Biomacromolecules*. 2013;14:3001-3009.
129. Pekdemir ME, Ertürkan D, Külah H, Boyacı IH, Özgen C, Tamer U. Ultrasensitive and selective homogeneous sandwich immunoassay detection by Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). *Analyst*. 2012;137:4834-4840.
130. invitrogen. Molecular Probes™ Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Published online 2010.
131. Küstner B. Wirkstoff-Substrat- Charakterisierung und Protein-Lokalisierung mittels Raman-Streuung, Julius Maximilians Universität Würzburg. Published online 2009.
132. Universität Bayreuth. Adsorption — Oberflächenbestimmung nach der BET Methode. Published online 2008.
133. Agarwal AK, Kadu MS, Pandhurnekar CP, Muthreja IL. Langmuir, Freundlich and BET Adsorption Isotherm Studies for Zinc ions onto coal fly ash. 2014;3.
134. Patiha, Herald E, Hidayat Y, Firdaus M. The langmuir isotherm adsorption equation: The monolayer approach. *Materials Science and Engineering*. 2016;107:1-9.
135. Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Mol Biotechnol*. 2013;55(3):217-226.
136. Fisher Scientific. Protein Blotting Handbook Tips and Tricks.
137. Abcam. *Dot Blot Protocol*. <https://www.abcam.com/protocols/dot-blot-protocol>
138. Johrdan L. Vergleichende Analysen Antigen-beladener Nanopartikel mit UVinaktivierten Kapsid-modifizierten Adenoviren in einem Proteinbasierenden Immunisierungs-Ansatz im Ovalbumin-Modell, Ruhr Universität Bochum. Published online 2011.
139. Raschke G. Molekulare Erkennung mit einzelnen Gold-Nanopartikeln, Ludwig Maximilians Universität. Published online 2005.
140. Lakshmipriya T, Tang TH. Biotin-Streptavidin Competition Mediates Sensitive Detection of Biomolecules in Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *PLOS ONE*. 2016;11(3):1-14.
141. Shao Q, Hall CK. Protein adsorption on nanoparticles: model development using computer simulation. *J Phys: Condens Matter*. 2016;28(41):1-27.
142. Thermo Fisher scientific. Instructions NHS and Sulfo-NHS. Published online 2011.

143. Thermo Scientific. easy molecular bonding crosslinking technology Reactivity chemistries, applications and structure references. Published online 2012.
144. Zhang Y, Walkenfort B, Yoon JH, Schlücker S, Xie W. Gold and silver nanoparticle monomers are non- SERS-active: a negative experimental study with silica-encapsulated Raman-reporter-coated metal colloids. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17:21120-21126.
145. Dominguez-Medina S, Blankenburg J, Olson J, Landes CF, Link S. Adsorption of a Protein Monolayer via Hydrophobic Interactions Prevents Nanoparticle Aggregation under Harsh Environmental Conditions. *ACS Sustain Chem Eng*. 2013;1(7):833-842.
146. Shaw A, Hoffercker IT, Smyrlaki I, et al. Binding to nanopatterned antigens is dominated by the spatial tolerance of antibodies. *Nature Nanotechnology*. 2019;14:184-190.
147. Schlücker S, Salehi M, Bergner G, et al. Immuno-Surface-Enhanced Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Immunohistochemistry with Target-Specific Metallic Nanoparticles and Nonlinear Raman Microscopy. *Anal Chem*. 2011;83(18):7081-7085.
148. Sotnikov D, Zherdev AV, Dzantiev BB. Development and Application of a Label-Free Fluorescence Method for Determining the Composition of Gold Nanoparticle-Protein Conjugates. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):907-923.
149. Pellegrino T, Sperling RA, Alivisatos AP, Parak WJ. Gel Electrophoresis of Gold-DNA Nanoconjugates. *Jurnal of Biomedicine and Biotechnology*. 2007;2:1-9.
150. Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *American Chemical Society*. 2011;27(16):10119-10123.
151. AppliChem. Agarose-Gel-Elektrophorese. Published online 2009.
152. Lin Y-J, Wu C-Y, Li T, Hsiao P-W, Chang D-K. A Rapid and Sensitive Early Diagnosis of Influenza Virus Subtype via Surface Enhanced Raman Scattering. *J Biosens Bioelectron*. 2014;5(2):1-5.
153. Hwang J, Lee S, Choo J. Application of a SERS-based lateral flow immunoassay strip for the rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B. *Nanoscale*. 2016;8:11418-11425.
154. Xie W, Schlücker S. Medical applications of surface-enhanced Raman scattering. *PhysChem Chem Phys*. 2013;15:5329-5344.
155. Slagle KM, Ghosn SJ. Immunoassays Tools for Sensitive, Specific, and Accurate Test Results. *LABORATORY MEDICINE*. 1996;27:177-183.
156. Fingerova H. Immunoassay- A brief guide through its history, principles, practice and future trends. Presented at the: Palacký University Medical School, Olomouc,.
157. Lepowsky E, Ghaderinezhad F, Knowlton S, Tasoglu S. Paper-based assays for urine analysis. *BIOMICROFLUIDICS*. 2017;11(5):1-34.
158. Sellrie F. Immunotechnologische Verfahren zum Aufbau homogener Immunoassays sowie zur Selektion Antikörper produzierender Zellen. Published online 2007.
159. Wang G, Lipert RJ. Detection of the Potential Pancreatic Cancer Marker MUC4 in Serum Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal Chem*. 2011;83.



160. Rabbany SY, Marganski WA, Kusterbeck AW, Ligler FS. A membrane-based displacement flow immunoassay. *Biosensors & Bioelectronics*. 1998;13:939-944.
161. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS, Laiwattanapaisal W. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. *Lab Chip*. 2012;12:3392-3398.
162. Kaminska A, Winkler K, Kowalska A, et al. SERS-based Immunoassay in a Microfluidic System for the Multiplexed Recognition of Interleukins from Blood Plasma: Towards Picogram Detection. *Scientific Reports*. 2017;7:1-11.
163. Torul H, Çiftçi H, Çetin D, Suludere Z, Boyacı IH, Tamer U. Paper membrane-based SERS platform for the determination of glucose in blood samples. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(27):8243-8251.
164. Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards (ReCCS). JCCRM 912-3 Certificate of Analysis. Published online 2018.
165. Han XX, Zhao B, Ozaki Y. Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Anal Bioanal Chem*. 2009;394(7):1719-1729.
166. Krasnoslobodtsev AV, Torres MP, Kaur S, et al. Improved SERS-based Nano-Immuno Assay for Detection of Cancer Biomarkers. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015;11(1):167-173.
167. Oliveira MJ, Quaresma P, de Almeida M, et al. Office paper decorated with silver nanostars - an alternative cost effective platform for trace analyte detection by SERS. *Scientific Reports*. 2017;7:2480-2494.
168. Cho I-H, Bhandari P, Patel P, Irudayaraj J. Membrane filter-assisted surface enhanced Raman spectroscopy for the rapid detection of E. coli O157:H7 in ground beef. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015;64:171-176.
169. Jenkins JA, Dube L, Luo Y, et al. A polymer hydrogel modified lateral flow sensing platform. *Sensors and Actuators B*. 2018;262:493-498.
170. Zhang K, Zhao J, Xu H, Li Y, Ji J, Liu B. Multifunktional Paper Strip Based on Self-Assembled Interfacial Plasmonic Nanoparticle Arrays for Sensitive SERS Detection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(3):16767-16774.
171. Yu WW, White IM. A simple filter-based approach to surface enhanced Raman spectroscopy for trace chemical detection. *Analyst*. 2012;137(5):1168-1173.
172. Holstein CA, Chevalier A, Bennett S, et al. Immobilizing affinity proteins to nitrocellulose: a toolbox for paper-based assay developers. *Anal Bioanal Chem*. 2015;408(5):1335-1346.
173. Tovey ER, Baldo BA. Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1989;19:169-184.
174. Fisher Scientific. Protein Blotting Handbook Tips and Tricks. Published online 2019. Accessed February 26, 2019. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-gel-electrophoresis-information/western-blot-tips-tricks.html>

175. AppliChem. Transfer Membranes. Published online 2008.
176. Abcam. A comparison between polyclonal and monoclonal Key differences, advantages and disadvantages. Published online March 11, 2019. Accessed March 11, 2019. <https://docs.abcam.com/pdf/antibody-guide/a-comparison-between-polyclonal-and-monoclonal.pdf>
177. Ritter MA. Polyclonal and Monoclonal Antibodies. *Methods in Molecular Medicine*. 2000;40:23-34.
178. Majumder M, Rendall CS, Eukel JA, et al. Overcoming the “Coffee-Stain” Effect by Compositional Marangoni-Flow-Assisted Drop-Drying. *J Phys Chem B*. 2012;116(22):6536-6542.
179. Hu H, Larson RG. Marangoni Effect Reverses Coffee-Ring Depositions. *J Phys Chem B*. 2006;110(14):7090-7094.
180. Baldwin KJ, Batchelder DN. Confocal Raman Microspectroscopy through a Planar Interface. *APPLIED SPECTROSCOPY*. 2001;55:517-524.
181. Tomba JP, Arzondo LM, Pastor JM. Depth Profiling by Confocal Raman Microspectroscopy: Semi-empirical Modeling of the Raman Response. *APPLIED SPECTROSCOPY*. 2007;61(2).
182. Overall N. Depth Profiling With Confocal Raman Microscopy, Part I. *Spectroscopy*. 2004;19(10):22-27.
183. Overall N. Depth Profiling with Confocal Raman Microscopy, Part II. *Spectroscopy*. 2004;19(11):22-27.
184. Overall N, Lapham J, Adar F, Whitley A, Lee E, Mamedov S. Optimizing Depth Resolution in Confocal Raman Microscopy: A Comparison of Metallurgical, Dry Corrected, and Oil Immersion Objectives. *APPLIED SPECTROSCOPY*. 2007;61(3):251-259.
185. Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*. 2018;62(1):2841.
186. Trefalt G, Borkovec M. Overview of DLVO Theory. Published online 2014. [www.colloid.ch/dlvo](http://www.colloid.ch/dlvo)
187. Herz M, Knabner P. Modeling and simulation of coagulation according to DLVO-theory in a continuum model for electrolyte solutions. Published online 2016.
188. Cukalevski R, Ferreira SA, Dunning CJ, Berggård T, Cedervall T. IgG and fibrinogen driven nanoparticle aggregation. *Nano Research*. 2015;8(8):2733-2743.
189. Gary R, Garbone G, Petriashvili G, De Santo MP, Barberi R. Detection of Gold Nanoparticles Aggregation Growth Induced by Nucleic Acid through Laser Scanning Confocal Microscopy. *Sensors*. 2016;16(2):258.
190. Chakroun N, Hilton D, Ahmad SS, Platt GW, Dalby PA. Mapping the Aggregation Kinetics of a Therapeutic Antibody Fragment. *Mol Pharmaceutics*. 2016;13:307-319.
191. Dominguez-Medina S, Kisley L, Tauzin LJ, et al. Adsorption and Unfolding of a Single Protein Triggers Nanoparticle Aggregation. *ACS Nano*. 2016;10:2103–2112.

192. Moerz ST, Kraegloh A, Chanana M, Kraus T. Formation Mechanism for Stable Hybrid Clusters of Proteins and Nanoparticles. 2015;9(NO. 7):6696-6705.
193. Wang Y, Tang L-J, Jiang J-H. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based, Homogeneous, Multiplexed Immunoassay with Antibody-Fragments-Decorated Gold Nanoparticles. *Anal Chem*. 2013;85:9213–9220.
194. Tomba JP, Arzondo LM, Pastor JM. Depth Profiling by Confocal Raman Microspectroscopy: Semi-empirical Modeling of the Raman Response. *APPLIED SPECTROSCOPY*. 2007;61(2):177185.
195. Porter MD, Lipert RJ, Siperko LM, Wang G, Narayanan R. SERS as a bioassay platform: fundamentals, design, and applications. *Chem Soc Rev*. 2008;37(5):1001-1011.
196. Smolsky J, Kaur S, Hayashi C, Batra SK, Krasnoslobodtsev AV. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Immunoassay Technologies for Detection of Disease Biomarkers. *Biosensors*. 2017;7(1):2-21.
197. Fan M, Andrade GFS, Brolo AG. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*. 693:7-21.
198. Azevedo AM, Romano VC, Prazeres DM, Vojinovic V. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. 2003;9:199-247.
199. Tessmer I, Kaur P, Lin J, Wang H. Investigating bioconjugation by atomic force microscopy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2013;11(25):1-17.
200. Rao A, Schoeneberger M, Gnecco E, Glatzel Th, Meyer E. Characterization of nanoparticles using Atomic Force Microscopy. *Journal of Physics: Conference Series*. 2007;61:971-976.
201. Klapetek P, Valtr M, Nečas D, Salyk O, Dzik P. Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions. *Nanoscale Research Letters*. 2011;6(514):1-9.
202. Hashim A. *SMART NANOPARTICLES TECHNOLOGY*. 1st ed.; 2012.
203. Lipsitch M, Tchetgen E, Cohen T. Negative Controls A Tool for Detecting Confounding and Bias in Observational Studies. *Epidemiology*. 2010;21(3):383-388.
204. Hampel B, Liu B, Nording B, et al. Approach to determine measurement uncertainty in complex nanosystems with multiparametric dependencies and multivariate output quantities. *Meas Sci Technol*. 2018;29:1-13.
205. Chandramouli K, Qian P-Y. Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. *Human Genomics and Proteomics*. 2009;2009:1-22.
206. Kinzig A, Starrett D. Coping With Uncertainty: A Call for a New Science-Policy Forum. 2003;32(5):330-335.
207. Palmer TN, Hardaker PJ. Handling uncertainty in science. *Phil Trans R Soc A*. 2011;369:4681-4684.
208. Kato K, Lian L-Y, Barsukov IL, et al. Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure*. 1995;3(1):79-85.

- 209. Thermo Scientific. Immunoprecipitation (IP) technical guide and protocols TECH TIP # 64. Published online 2009.
- 210. Zeeck C. Western Blot Eine Einführung zu den Prinzipien mit hilfreichen Tipps. abcam discover more presented at the: January 22, 2013.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

AgNP	Silbernanopartikel
AuNP	Goldnanopartikel
BSA	Bovine serum albumin
bx	Mischung Spike y mit Analyt x
bz	Referenzmischung Spike y mit Referenz z
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
Hb	Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ID	Isotopenverdünnung
IgG	Immunglobulin G
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PLS	Partial least square, partiell kleinste Quadrate

PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
Rili-Bäk	Richtlinien der Bundesärztekammer
RMSECV	Root mean square error of cross validation
RT	Raumtemperatur
SAM	Selbst organisierte Monolage (engl. self assembled monolayer)
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. Small-angle X-ray scattering)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie
SI	Internationales Einheitensystem
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNB	5-Thio-2-nitro-benzoesäure
UV/Vis	Ultraviolett und sichtbar

**6.2                    Symbolverzeichnis**

$\mu\text{g}$                     Mikrogramm

$\mu\text{L}$                     Mikroliter

$\text{g}$                     Gramm

$\text{h}$                     Stunden

$\text{kDa}$                     Kilodalton

$\text{kV}$                     Kilovolt

$\text{mA}$                     Milliampere

$\text{mg}$                     Milligramm

$\text{min}$                     Minute

$\text{mL}$                     Milliliter

$\text{nm}$                     Nanometer

$\text{s}$                     Sekunde

$\text{V}$                     Volt

$\lambda$                     Wellenlänge

### 6.3 Verwendete Geräte und Proteine

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Geräte.

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
UV/Vis Spektrometer Lambda 1050	Perkin Elmer
SAXSess mc2	Anton Paar
ChemiDoc Touch Imaging System	Bio-Rad®
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad®
LabRam Aramis	Horiba Jobin-Yvon
Rasterelektronenmikroskop Supra 40	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Detektor X-Max 80 mm <sup>2</sup> SDD-Detektor	Oxford Instruments
Mini-Sub Cell GT Cell (Agarosegele)	Bio-Rad®

**Tabelle 2 :** Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie Proteine

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Spezifität</b>
<b>Anti-Human Hemoglobin, A80-134A</b>	Biomol	Ziege	Polyklonal
<b>Anti-Hemoglobin antibody [11-201.11]</b>	Abcam	Ziege	Monoklonal
<b>Atto 633 anti mouse IgG</b>	ATTO-TEC GmbH	Ziege	Polyklonal(sekundär)
<b>Hämoglobin</b>	Instand e.V.	Human	Zertifiziertes Material



## 6.4 Ergänzende Daten und Informationen

### Kontrollkarte für die Herstellung von Stammlösungen

#### Kontrollkarte zur Herstellung einer DTNB Stammlösung aus einem Feststoff

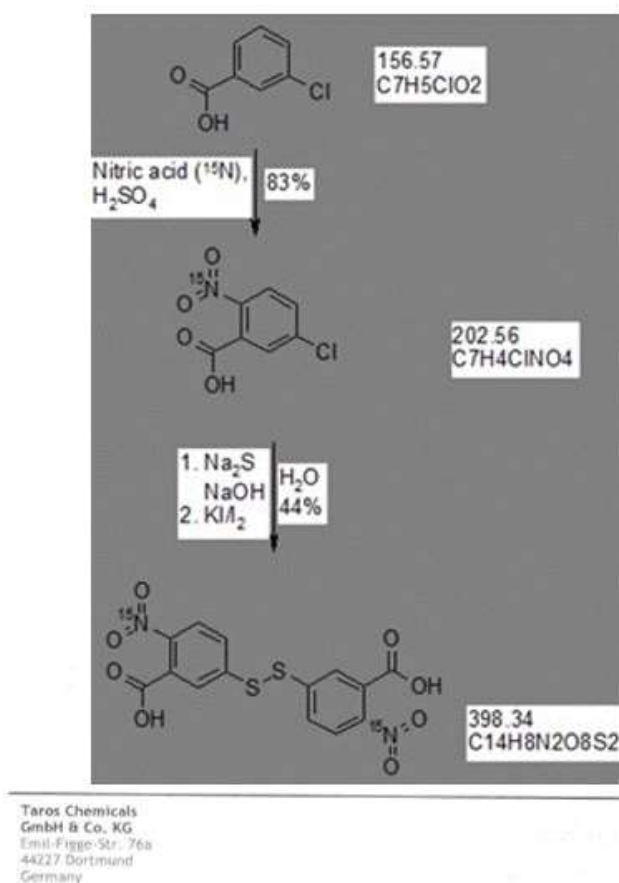
$\rho_{\text{kal}_S}$  in kg/m<sup>3</sup> 8000  
 $\rho_{\text{kal}_M}$  in kg/m<sup>3</sup> 7950  
 $M_{\text{EtOH}}$  in g/mol 46,06844

Materialbezeichnung	DTNB	$f_{\text{pur}}$ in g/g	0,990000	M in g/mol	396,34	$\rho$ in g/cm <sup>3</sup>	1,00	
Flaschen-Nr.	DTNB-1	V in mL	20,0	-material	PFA	$\rho$ in g/cm <sup>3</sup>	2,23	
Lösungsmittel	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	w in %	100	w <sub>Lsg.</sub> in %	100	$\rho$ in g/cm <sup>3</sup>	0,789	
		Material- dichte in g/cm <sup>3</sup>		Luftdruck in hPa	Luftfeuchtig- keit, relativ in %	Luft- temperatur in °C	Luftdichte in kg/m <sup>3</sup>	Wägewert Flasche, leer in g
Datum, Uhrzeit	23.11.2017 08:35							bearbeitet von
$m_{1M}$ (Flasche, leer) in g	12,36487	2,23	991	49,5	21,7	1,16540599		Schmidt
$m_{1M}$ (korrigiert) in g	12,36952							
Datum, Uhrzeit	23.11.2017 08:40							
$m_2$ (DTNB) in g	0,085120	1,00	991	47,8	21,6	1,16603893		Schmidt
$m_{2,1}$ (korrigiert) in g	0,085207							
Datum, Uhrzeit	23.11.2017 09:00							
$m_3$ (Flasche+Lsg.) in g	28,4038	0,789	991	47,5	21,5	1,16650975		Schmidt
$m_4$ (Lsg.) in g	16,03893						12,3648656	
$m_{4,1}$ (korrigiert) in g	16,06033							
w(DTNB) in µg/g	5252,37659							
b(DTNB) in mmol/kg	13,25220							
c(DTNB) in mmol/L	10,45599							
<b>vor Entnahme</b>								
Datum, Uhrzeit	23.11.2017 09:55							
$m_3$ (Flasche+Lsg.) in g	28,35450	0,789	991	47,5	21,5	1,16650975		Schmidt
$m_4$ (Lsg.) in g	15,98963						12,3648656	
$m_{4,1}$ (korrigiert) in g	16,01096							
w(DTNB) in µg/g	5268,57097							
b(DTNB) in mmol/kg	13,29306							
c(DTNB) in mmol/L	10,48822							
<b>nach Entnahme</b>								
Datum, Uhrzeit	23.11.2017 10:00							
$m_3$ (Flasche+Lsg.) in g	22,83754	0,789	991	49,3	23,5	1,15760374		Schmidt
$m_4$ (Lsg.) in g	27,84370						12,3649011	
$m_{4,1}$ (korrigiert) in g	27,88055							
w(DTNB) in µg/g	5268,57097							
b(DTNB) in mmol/kg	13,29306							
c(DTNB) in mmol/L	10,48822							

Abbildung 51: Darstellung einer Kontrollkarte für die Herstellung einer Stammlösung.

**Synthese von  $^{15}\text{N}_2\text{DTNB}$** 

Die nachfolgende Abbildung 52 stellt schematisch in Auszügen die von Taros Chemicals GmbH & Co. KG durchgeführte Auftragssynthese von  $^{15}\text{N}_2\text{DTNB}$  dar. Die Synthese wurde in mehreren Einzelschritten durchgeführt, um zu dem gewünschten Endprodukt  $^{15}\text{N}_2\text{DTNB}$  zu gelangen. Das Produkt wurde mit einer Reinheit von 96% erhalten.



**Abbildung 52:** Synthese von  $^{15}\text{N}_2\text{DTNB}$  mit den einzelnen Schritten der Herstellung. Durchgeführt von Taros Chemicals.

## SAXS Messungen

Die Tabelle dient der Ergänzung der in Abbildung 13 dargestellten Daten.

**Tabelle 3:** Mit SAXS gemessene Durchmesser von AuNP mit unterschiedlicher Funktionalisierung sowie Darstellung von Hämoglobin und Antikörper.

<b>Goldnanopartikel</b>	<b>Durchmesser / nm</b>
AuNP 10 nm OD 1 von BBI solutions	8,65
AuNP 10 nm umgepuffert in HEPES	8,74
AuNP 10 nm + DTNB	8,65
AuNP 10 nm + DTNB + anti Hb Antikörper	8,64
AuNP 10 nm + DTNB + anti Hb Antikörper + Hb	9,12
Hb in HEPES 13 g/L	6,2
anti Hb Antikörper 1,1 $\mu$ M	nicht messbar

## Erstellung der Mischungsverhältnisse

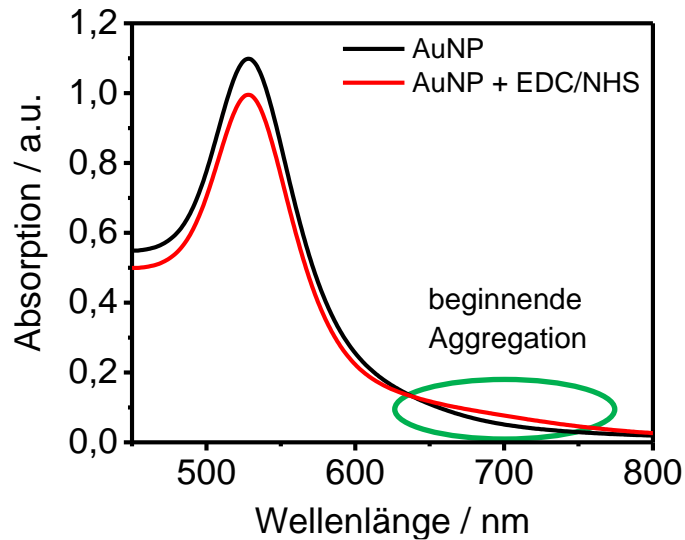
Für die Erstellung der Mischungsverhältnisse wurden DTNB und DTNB\* sowie die damit funktionalisierten AuNP in den in Tabelle 4 angegebenen Anteilen gemischt.

**Tabelle 4:** Erstellte der Mischungsverhältnisse

<b>Anteile DTNB</b>	<b>Anteile DTNB*</b>
<b>100</b>	<b>0</b>
<b>80</b>	<b>20</b>
<b>70</b>	<b>30</b>
<b>60</b>	<b>40</b>
<b>55</b>	<b>45</b>
<b>50</b>	<b>50</b>
<b>45</b>	<b>55</b>
<b>40</b>	<b>60</b>
<b>30</b>	<b>70</b>
<b>20</b>	<b>80</b>
<b>0</b>	<b>100</b>

**Kovalente Kopplung von Antikörpern mittels EDC/NHS**

Abbildung 53 zeigt die Zugabe von EDC/NHS zu den AuNP.

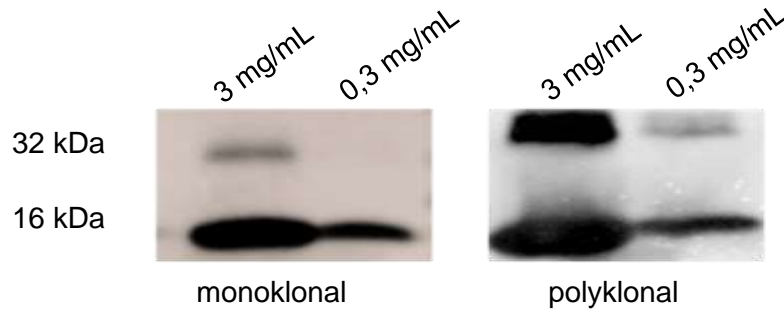


**Abbildung 53:** UV/Vis-Spektrum von AuNP Antikörper-Funktionalisierung durch Zugabe von EDC/NHS. Deutlich zu sehen ist eine Abnahme des Absorptionsmaximums und eine beginnende Aggregation der AuNP.

Die Zugabe von EDC/NHS verändert die Oberflächeneigenschaften der AuNP in diesem Falle so, dass diese beginnen zu aggregieren. Ein Anstieg der Absorption im Bereich von 700 nm ist ein erstes Anzeichen dafür, dass eine Partikelsuspension nicht mehr stabil ist und sich erste Partikelaggregate gebildet haben.

**SDS-PAGE mit Western Blot**

Die Detektionsfähigkeiten des monoklonalen und des polyklonalen-anti-Hämoglobin-Antikörpers wurde mit einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot in Abbildung 54 dargestellt.



**Abbildung 54:** Western Blot der Überprüfung der Bindungsfähigkeit der monoklonalen und polyklonalen anti-Hämoglobin Antikörper. Deutlich zu erkennen ist eine sehr gute Detektionsfähigkeit beider Antikörper bei den verwendeten Konzentrationen.

Das als Tetramer vorliegende Hämoglobin, welches eine Größe von ca. 66 kDa aufweist, zerfällt in Untereinheiten von ca. 32 kDa und 16 kDa<sup>16,210</sup>, welche sehr deutlich in dem Western Blot zu erkennen sind und dem Größenstandard zuzuordnen sind. Sowohl der monoklonale als auch der polyklonale Antikörper detektieren die 16 kDa Bande in den eingesetzten Konzentrationen von 3 mg/mL und 0,3 mg/mL. Die Bande der größeren Untereinheit von 32 kDa ist bei beiden Antikörpern schwächer und in der niedrigeren Konzentration nur bei dem polyklonalen Antikörper zu sehen.

## 6.5 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Darstellung verschiedener Formen eines ELISA. Die blaue Kugel stellt den Analyten dar. Die Antikörper sind farblich je nach Funktion dargestellt, primäre „Fängerantikörper“ in schwarz und violett sowie der sekundäre in grau. Die rosa Kugel stellt das Enzym dar, das die Umsetzung eines Substrats katalysiert; a) stellt einen direkten ELISA dar, bei dem der Analyt auf der Oberfläche immobilisiert wird; b) stellt einen indirekten ELISA dar, bei dem das Antigen über eine Kaskade von zwei spezifischen Antikörpern detektiert wird; c) zeigt einen Immuno-Sandwich-Assay, bei dem der primäre Antikörper immobilisiert wird und d einen kompetitiven ELISA. Abbildung verändert nach <sup>20</sup>.

..... 13

**Abbildung 2:** Darstellung eines IgG-Antikörpers. Ein typischer IgG-Antikörper besteht aus zwei leichten mit je 25 kDa (blau) und zwei schweren Ketten je 50 kDa (schwarz), welche über Disulfidbrücken (grün) miteinander verbunden sind. Die Fab Fragmente bilden die spezifischen antigenbindenden Regionen des Antikörpers. Die Fc-Region hingegen stellt eine stetige Region des Antikörpers dar und kann für die Immobilisierung auf Oberflächen genutzt werden..... 15

**Abbildung 3:** Die Abbildungen 3a-c stellen die unelastischen und elastischen Anteile der Raman-Streuung sowie die Rayleigh-Streuung schematisch dar. Abbildung verändert nach <sup>34</sup>. ..... 19

**Abbildung 4:** Ramanaktive Schwingungen dreiatomiger Moleküle am Beispiel von H<sub>2</sub>O. Bei allen drei Schwingungsmoden (a-c) kommt es zu einer Veränderung des Polarisationsellipsoids..... 21

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung eines sphärischen Nanopartikels und der Oberflächen-Plasmonenresonanz dieser. Abbildung verändert nach <sup>48</sup>..... 22

**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der ID. Zunächst werden Kalibrierlösungen bestehend aus Referenz z und dem Spike y hergestellt. Die Messungen der Kalibrierlösungen ergeben ein PLS-Vorhersagemodell. Die Probe (x) und Referenz (z) werden jeweils mit dem Spike gemischt. Die Messungen der Spektren ergeben die Isotopenverhältnisse  $R_{bx}$  (Probe) und  $R_{bz}$  (Referenz) werden in die Analytkonzentration mit der Unsicherheit  $c_x \pm U(c_x)$  umgewandelt. Abbildung übernommen von <sup>68</sup>.

..... 27

**Abbildung 7:** Humanes Blut setzt sich zusammen aus ca. 50 Vol.-% fester Bestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Die flüssigen bzw. gelösten Bestandteile wie Serum und Fibrinogene stellen die weiteren rund 50 Vol.-% des Plasmas dar. Die Struktur von Hämoglobin zeigt den tetrameren Aufbau mit jeweils zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten. .... 29

**Abbildung 8:** Youden-Plots stellen eine Möglichkeit des Vergleiches von Messergebnissen verschiedener Laboratorien dar. Dies wird am Beispiel des Ringversuches für die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration (OH2/17) gezeigt. Die grauen Punkte stellen die Gesamtzahl der Teilnehmer des Ringversuches dar. Die Laboratorien messen die Proben A und B mit ihrer jeweiligen Methode, deren Messwert als blauer Punkt in dem Plot zu sehen ist. Das grüne Rechteck stellt die Bewertungsgrenzen der jeweiligen Methode dar und zeigt, inwiefern die Ergebnisse innerhalb dieser Werte liegen. Abbildung verändert nach Ringversuch OH2/17<sup>6,7</sup>. .... 32

**Abbildung 9:** Aufbau des Raman-Spektrometers von LabRam Aramis von Horiba Jobin-Yvon; a) stellt den Strahlengang innerhalb des Spektrometers dar. Durch die Veränderung des Strahlenganges kann entweder in der Makrokammer in Medium oder in der Mikrokammer unter dem Mikroskop gemessen werden; b) Foto der Messapparatur. .... 33

**Abbildung 10:** a) Beispielhafte Darstellung einer DFT-Simulation von DTNB mit den charakteristischen DTNB-Banden bei ca. 1330 cm<sup>-1</sup>; b) zeigt ein DTNB-Molekül..... 35

**Abbildung 11:** Gravimetrische Herstellung von Stammlösungen. Die Proben sowie die Gefäße müssen zunächst in dem Wägezimmer akklimatisiert werden. Mit Hilfe der Daten ist eine Berechnung

der jeweiligen Konzentrationen und Unsicherheiten möglich. Gleichzeitig können die Ansätze so auf einen Verlust an Material bei der Entnahme oder durch Verdunstung überprüft werden. ....	36
<b>Abbildung 12:</b> a) Kalibriergerade für die Bestimmung der Antikörperkonzentration im Überstand der AuNP Suspensionen nach der Funktionalisierung mit Antikörper; b) Werte für die Berechnung der Konzentration im Überstand. Abbildung verändert nach <sup>102</sup> . ....	39
<b>Abbildung 13:</b> SAXS-Messungen der Radien funktionalisierter AuNP. a) SAXS Kurvenverläufe von funktionalisierten AuNP. Die 10 nm Partikel weisen einen Radius von 4,3 nm (Durchmesser 8,6 nm) auf; b) Unterschiede zwischen den einzelnen Funktionalisierungen der AuNP sind nur geringfügig zu sehen. Die einzelnen Werte der Radien und Durchmesser können in Tabelle 3 auf Seite 131 entnommen werden. ....	41
<b>Abbildung 14:</b> Kalibriermodell bestehend aus 11 verschiedenen Mischungsverhältnissen aus DTNB und DTNB*. Abbildung a) zeigt alle Mischungsverhältnisse beginnend von 100 % TNB* bis zu 0 %. Die Spektren wurden auf die Bande bei 1600 cm <sup>-1</sup> normiert und eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Aus Gründen der besseren Übersicht sind nur 11 der insgesamt 99 Spektren dargestellt. Abbildung b) zeigt eine Vergrößerung der für die Auswertung relevanten Banden von TNB und TNB*. Deutlich sichtbar sind die einzelnen Abstufungen der Intensitäten in Abhängigkeit der Mischungsverhältnisse. ....	50
<b>Abbildung 15:</b> Auswertung des Kalibriermodells mit insgesamt 99 Spektren. Die grünen Quadrate stellen die einzelnen Messpunkte dar, die für jedes der eingewogenen Mischungsverhältnisse stehen. Dabei erfolgt ein Vergleich zwischen den eingewogenen und den gemessenen Stoffmengenverhältnissen. ....	51
<b>Abbildung 16:</b> DTNB zeichnet sich besonders durch die an den aromatischen Ring (dunkelgrau) gebundenen Nitrogruppen (blau) aus. Verbunden sind die zwei aromatischen Ringe über eine Disulfidbrücke (gelb). Rot dargestellt sind Sauerstoffatome.. ....	53
<b>Abbildung 17:</b> Simulationen der SERS-Spektren von DTNB (nat), (a) DTNB <sup>13</sup> C <sub>all</sub> , (b) <sup>13</sup> C <sub>2</sub> und (c) <sup>15</sup> N <sub>2</sub> . Charakteristisch für DTNB sind die Banden bei ca. 1330 cm <sup>-1</sup> , die bei allen Isotopen-angereicherten Varianten zu sehen sind. Eine deutliche Verschiebung dieser Bande tritt nur bei der Substitution von <sup>14</sup> N <sub>2</sub> gegen <sup>15</sup> N <sub>2</sub> auf. Weitere Verschiebungen sind bei <sup>13</sup> C <sub>all</sub> und <sup>13</sup> C <sub>2</sub> in den Bereichen von 1000 cm <sup>-1</sup> – 1100 cm <sup>-1</sup> und 1500 cm <sup>-1</sup> – 1600 cm <sup>-1</sup> zu erkennen.....	54
<b>Abbildung 18:</b> Schematische Darstellung der Ausbildung einer SAM mit einem zeitlichen Verlauf der Bindung auf den AuNP. Abbildung a) zeigt ein metallisches Nanopartikel mit einer SAM eines ramanaktiven Markers; b) Zeitabhängigkeit der Adsorption von TNB auf den AuNP. In den ersten Minuten der Inkubation findet die Anlagerung des Großteils der Moleküle statt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit ist nur noch ein leichter Anstieg der Verschiebung zu messen.....	57
<b>Abbildung 19:</b> Darstellung der Verschiebung des Absorptionsmaximums bei der Ausbildung einer SAM aus TNB. Abbildung a) zeigt die verschiedenen Inkubationspunkte während der Messungen mit UV/Vis. Abbildung b) zeigt die Verschiebung von 1,8 nm die nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bestimmt wurde. Die Spektren wurden für eine bessere Vergleichbarkeit der Banden auf 1 normiert. ....	58
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich der Simulationen von DTNB und DTNB* mit realen Messungen. Abbildung a) zeigt die Simulationen von DTNB und DTNB*; b) zeigt SERS-Spektren von mit TNB und TNB* funktionalisierten AuNP.....	59
<b>Abbildung 21:</b> Western Blot nach nativer Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden Proben mit einer Konzentration von 0,3 mg/mL; 0,03 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,003 mg/mL Hämoglobin. Verwendet wurden ein monoklonaler und ein polyklonaler anti-Hämoglobin-Antikörper. Die Detektion des Hämoglobins erfolgte mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern. Dabei wird ein Chemilumineszenz-Substrat durch die HRP umgesetzt und Licht emittiert, welches mit einem Fotofilm aufgenommen werden kann.....	61

<b>Abbildung 22:</b> Dot Blot mit Hämoglobinlösungen von 1 mg/mL, 0,1 mg/mL und 0,01 mg/mL. Der polyklonale und der monoklonale Antikörper zeigen ähnliche Intensitäten bei der Detektion des Hämoglobins. Die Detektion ist bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/mL möglich. Die Detektion des Hämoglobins erfolgte mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern. Bei der Umsetzung eines Chemilumineszenz-Substrates durch die HRP wird Licht emittiert, welches aufgenommen werden kann. ....	62
<b>Abbildung 23:</b> Größenvergleich eines IgG-Antikörpers mit 10 nm AuNP und TNB. Sowohl Antikörper als auch AuNP sind im Vergleich zu den TNB Molekülen um mehr als das 10 fache größer. ....	64
<b>Abbildung 24:</b> Messungen von mit Antikörper funktionalisierten AuNP; a) Es erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda \sim 523,68$ nm nach $\lambda \sim 528,82$ im Falle von anti-Hämoglobin IgG-Antikörpern; b) Vergrößerte Darstellung.....	65
<b>Abbildung 25:</b> Beladung der AuNP (lila) mit IgG-Antikörpern (schwarz) und die möglichen Ausrichtungen der Antikörper. Das Antigen ist in Gelb dargestellt; a) zeigt einen wenig beladenen Partikel mit teilweise eingeschränkter Bindungsfähigkeit; b) zeigt ein mäßig beladenes Partikel mit ebenfalls eingeschränkter Bindungsfähigkeit trotz mehr vorhandener Antikörper; c) zeigt einen viel beladenen Partikel mit der gleichen Anzahl an verfügbaren Antigenbindungsstellen. Abbildung verändert nach <sup>103</sup> . ....	66
<b>Abbildung 26:</b> Weitere Funktionalisierung der AuNP (bereits mit TNB und Antikörper funktionalisiert) mit Hämoglobin. Deutlich wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums mit zunehmender Beschichtung der Partikel. ....	68
<b>Abbildung 27:</b> Vergleich zwischen unterschiedlich beladenen AuNP; a) zeigt die Beladung der AuNP mit jeweils 0,9 $\mu$ L Antikörper und Hämoglobin und b) die Beladung mit jeweils 3 $\mu$ L. Erkennbar ist ein unterschiedliches Laufverhalten der AuNP in Abhängigkeit von der Proteinbeladung. ....	69
<b>Abbildung 28:</b> Schema des ID-SERS-Immunoassays. Für den SERS-Immunoassay wird eine definierte Menge AuNP aus einem Ansatz entnommen und mit DTNB bzw. DTNB* in gleicher Weise umgesetzt. Die grünen Kugeln stehen dabei für die Funktionalisierung mit TNB und die roten Kugeln stehen für die Funktionalisierung mit TNB*. Die weiteren Funktionalisierungen mit Hämoglobin und Antikörper erfolgten für beide Wege analog, wobei der Ansatz mit TNB* mit einer definierten Menge eines zertifizierten Hämoglobin-Standards, der TNB-Ansatz mit der Probe unbekannter Hämoglobin-Konzentration versetzt wird. Anschließend werden die beiden Ansätze in definierten Mengen gemischt und auf der Oberfläche eines mit Antikörpern funktionalisierten Trägermaterials immobilisiert. Nach erfolgter Immobilisierung kann die Oberfläche mittels Raman-Spektroskopie untersucht werden und es können SERS-Spektren (von TNB/TNB*) gemessen werden.....	72
<b>Abbildung 29:</b> Aufnahmen einer Cellulosenitrat-Membran. Abbildung a) zeigt eine Raman-Messung der Membran. Die Anregung erfolgte bei 633 nm und es sind deutlich Eigenbanden im Bereich von $853\text{ cm}^{-1}$ , $1285\text{ cm}^{-1}$ und $1375\text{ cm}^{-1}$ zu sehen. Abbildung b) zeigt eine REM-Aufnahme einer nicht funktionalisierten Membran. Die Membran weist eine inhomogene filamentartige Struktur auf. Messparameter: EHT=10.00 KV, Signal A= InLens, WD 4,4 mm Mag=26,73 KX. ....	75
<b>Abbildung 30:</b> Mit AuNP-Komplex funktionalisierte Cellulosenitrat-Membran. Deutlich erkennbar sind die rötlich aussehenden Spots, die von den immobilisierten AuNP stammen mit $I_{p1}$ gekennzeichnet. Der Spot weist am Rand eine stärkere Färbung auf als in der Mitte, $I_{p2}$ . Die nicht funktionalisierten Bereiche der Membran weisen keine Färbung auf, $I_{p3}$ . ....	77
<b>Abbildung 31:</b> Darstellung der Messmöglichkeiten des Raman-Spektrometers. Abbildung a) zeigt die Messung in der Makrokammer und b) stellt die Messungen unter dem Mikroskop in der Mikrokammer dar. ....	78
<b>Abbildung 32:</b> SERS-Messungen am Randbereich des AuNP-Spots auf der Cellulosenitrat-Membran. Abbildung a) zeigt eine Membran, die mit AuNP-TNB/TNB*-Antikörper-Hämoglobin einer optischen	



Dichte von 1 funktionalisiert wurde. Zu erkennen sind die prominenten Eigenbanden der Cellulosenitrat-Membran bei $1285\text{ cm}^{-1}$ . TNB/TNB* Banden bei $1330\text{ cm}^{-1}$ sind nicht zu erkennen. In Abbildung b) ist ein Ansatz mit einer optischen Dichte von 2 dargestellt. Zu sehen sind ebenfalls die prominenten Eigenbanden der Membran. Die charakteristischen Banden von TNB/TNB* haben eine leicht erhöhte Signalintensität. ....	79
<b>Abbildung 33:</b> SERS-Spektren einer Cellulosenitrat-Membran mit funktionalisierten AuNP. Die Abbildungen a-d stellen verschiedenen Fokusebenen dar. Dabei wurde zunächst auf der Membranoberfläche gemessen (a) und in Abständen von (b) $+8\text{ }\mu\text{m}$ , (c) $+5\text{ }\mu\text{m}$ und (d) $-10\text{ }\mu\text{m}$ in der Z-Ebene gemessen. Es erfolgte eine Normierung der Spektren auf 0 und 1. TNB-Bande grün markiert. ....	81
<b>Abbildung 34:</b> REM-Aufnahmen und EDX-Messung einer funktionalisierten Membran. Abbildung a) zeigt eine Membran ohne Funktionalisierung; b) zeigt eine funktionalisierte Membran mit immobilisiertem AuNP-Komplex; c) Die EDX-Auswertung zeigt, dass es sich bei den Partikeln auf der Membran um die immobilisierten AuNP handelt. ....	83
<b>Abbildung 35:</b> Ergebnisse der Reflexionsmessungen mit dem UV/Vis-Spektrometer. a) Die Spektren der Membranen zeigen eine unterschiedliche Reflexion bei der Wellenlänge von $530\text{ nm}$ ; b) Messapparatur für das Messen der Membranen ohne Deckel. ....	84
<b>Abbildung 36:</b> Schema der Membranfunktionalisierung und Messapparatur. a) Zeigt die Inkubation der gesamten Membran in der Antikörperlösung oder der AuNP Suspension; b) Messaufbau für die Messungen in der Mikrokammer. ....	85
<b>Abbildung 37:</b> Darstellung eines Raman-Mappings mit drei herausgegriffenen Einzelspektren eines Mischungsverhältnisses von 50% TNB und 50% TNB*. Das Mapping zeigt eine Fläche von $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$ . Die so entstandene Vielzahl an Spektren gibt einen Überblick über die auf der Membran immobilisierten AuNP. Die Einzelspektren zeigen ein sehr unterschiedliches Mischungsverhältnis. Die Spektren a) und b) zeigen TNB (grün markiert) und TNB* (rot markiert) nur das Spektrum c) zeigt das auf der Membran immobilisierte Mischungsverhältnis von 50% TNB;50% TNB*. ....	88
<b>Abbildung 38:</b> Darstellung der einzelnen Funktionalisierungsschritte der AuNP. Jeder dieser Schritte beinhaltet die Möglichkeit der Entstehung von AuNP-Aggregaten. Die Zentrifugationsschritte zwischen den Funktionalisierungen sind ebenfalls Einflussfaktoren für eine Aggregation der AuNP. ....	90
<b>Abbildung 39:</b> Entstehung von AuNP-Aggregaten durch die Zugabe von Hämoglobin. Beispielhafte Darstellung der Entstehung von Protein-bedingten Aggregaten bei $40\text{ nm}$ AuNP. Hämoglobin stellt einen Initiator der Partikelaggregation dar. Abbildung in Anlehnung an <sup>192</sup> . ....	93
<b>Abbildung 40:</b> Aufnahmen von Mikroreflexionsmessungen. Abbildung a) zeigt die Messung auf dem Querschnitt der Membran, die an einem Objektträger befestigt ist; b) zeigt den Vergleich der Messungen einer nicht funktionalisierten Membran (schwarz) und einer mit AuNP-Funktionalisierung (blau). Die Reflexionsmessungen wurden mit 20facher Vergrößerung durchgeführt. ....	94
<b>Abbildung 41:</b> Darstellung der Querschnitte der Cellulosenitrat-Membran mit einem Porendurchmesser von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ ; a) Zeigt eine nicht funktionalisierte Membran und b) eine Membran mit immobilisierten AuNP-Komplexen. Die AuNP sind weit in die Membran eingedrungen. Die Membran weist durch die AuNP unterschiedlich gefärbte Stellen auf. Messpunkte mit M1 und M2 markiert. ....	95
<b>Abbildung 42:</b> a) Vergleich der Mikroreflexion im UV/Vis-Bereich innerhalb der Membran. Gemessen wurden an den Stellen M1 und M2. M1 befindet sich im Querschnitt unterhalb von M1 und weist eine stärkere Reflexion auf als M2; b) zeigt SERS-Messungen mit einem eindeutigen TNB-Signal (grün markiert) bei ca. $1330\text{ cm}^{-1}$ . ....	96
<b>Abbildung 43:</b> Raman-Messung eines nicht funktionalisierten Glaswafers. Es ist eine Bande bei $1100\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Diese stellt für die SERS-Messungen bei $1330\text{ cm}^{-1}$ keine Beeinflussung dar. ....	98

<b>Abbildung 44:</b> Raman-Messung des Alexa Fluor® 633 Antikörpers. Die Detektion erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm. Es konnte so nachgewiesen werden, dass die Immobilisierung der Antikörper durch EDC/NHS Kopplung erfolgreich war. ....	99
<b>Abbildung 45:</b> Mikroskop-Aufnahmen von zwei mit AuNP funktionalisierten Glaswafern. a) Zeigt einen Wafer mit TNB* funktionalisierten AuNP; b) zeigt einen Wafer, der mit einer Mischung aus 50% TNB und 50% TNB* funktionalisierten AuNP beladen wurde. Der Wafer mit TNB* funktionalisierten Partikeln zeigt eine deutlich höhere Beladung mit AuNP. ....	100
<b>Abbildung 46:</b> Oberflächentopologie eines mit AuNP funktionalisierten Glaswafers; a) Zeigt die Größenverteilung der gemessenen AuNP; b) stellt die Topologie der immobilisierten AuNP dar und zeigt eine hohe Partikelkonzentration sowie vereinzelte Aggregate. ....	101
<b>Abbildung 47:</b> Darstellung eines Raman-Mappings mit drei Einzelspektren. Die durch das Mapping entstandene Vielzahl an Spektren gibt einen Überblick über die auf den Glaswafern immobilisierten AuNP. Die Einzelspektren zeigen ein geringfügig unterschiedliches Mischungsverhältnis. Die Spektren a) und b) zeigen einen leicht überwiegenden Anteil von TNB (grün markiert) oder TNB* (rot markiert) das Spektrum c) zeigt ein optimales Verhältnis der Mischung 50% TNB; 50% TNB*. ....	102
<b>Abbildung 48:</b> SERS-Spektren mit 11 verschiedenen Mischungsverhältnissen von mit TNB und TNB* funktionalisierter AuNP. Die Spektren stellen eine Mittelung des jeweiligen Mischungsverhältnisses eines Mappings dar. Abbildung a) zeigt alle Mischungsverhältnisse beginnend von 100% DTNB* bis zu 0%. Die Spektren wurden auf die Bande bei $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ normiert und eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Aus Gründen der Übersicht sind nur 11 Spektren dargestellt. Abbildung b) zeigt eine Vergrößerung der für die Auswertung relevanten Banden von TNB und TNB*. Eine genaue Abstufung der Verhältnisse ist nicht zu erkennen. Sie können nicht genau den tatsächlichen Verhältnissen zugeordnet werden. ....	103
<b>Abbildung 49:</b> Testformat auf den Glaswafern mit insgesamt 66 in die Auswertung eingeflossene Spektren. Abbildung a) und b) stellen die beiden tagesunabhängigen Messreihen dar. Es wird deutlich, dass sie mit $R^2$ von 91,76 und 98,83 eine unterschiedliche Qualität zeigen. Dies zeigt sich auch in dem RMSECV der bei Messreihe a) zudem hoch ist. Die Auswertung beider Messreihen von a und b ist in c dargestellt und zeigt ein $R^2$ von 94,42. ....	104
<b>Abbildung 50:</b> SERS-Kontrollmessungen eines 50% TNB und 50% TNB* Mischungsverhältnisses. Nur der Ansatz mit TNB* ist mit Antikörper und Hämoglobin funktionalisiert, der Ansatz mit TNB ist nur mit Antikörpern funktionalisiert. Die Bande bei $1330\text{ cm}^{-1}$ stellt die mit TNB funktionalisierten AuNP dar. ....	106
<b>Abbildung 51:</b> Darstellung einer Kontrollkarte für die Herstellung einer Stammlösung. ....	129
<b>Abbildung 52:</b> Synthese von $^{15}\text{N}_2\text{DTNB}$ mit den einzelnen Schritten der Herstellung. Durchgeführt von Taros Chemicals. ....	130
<b>Abbildung 53:</b> UV/Vis-Spektrum von AuNP Antikörper-Funktionalisierung durch Zugabe von EDC/NHS. Deutlich zu sehen ist eine Abnahme des Absorptionsmaximums und eine beginnende Aggregation der AuNP. ....	132
<b>Abbildung 54:</b> Western Blot der Überprüfung der Bindungsfähigkeit der monoklonalen und polyklonalen anti-Hämoglobin Antikörper. Deutlich zu erkennen ist eine sehr gute Detektionsfähigkeit beider Antikörper bei den verwendeten Konzentrationen. ....	133

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Dies sind meine ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe 3.12 optische Analytik, Dr. Rainer Stosch, Dr. Claudia Frank, Stefan Wundrack, Dr. Julia Molle und alle der Abteilung 3.1, die zu dem Vorankommen der Arbeit durch die zahlreichen Gespräche und Kaffeerunden beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich mich auch für die Unterstützung von Frau Prof. Dr. Petra Mischnick und Herrn Prof. Dr. Meinhard Schilling bedanken, der mich von der ersten Bioanalytik-Vorlesung bis hin zu dem Abschluss dieser Arbeit immer unterstützt hat. Mein Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Anett Schallmey und Herrn Prof. Dr. Karsten Hiller, die die Funktionen als zweite Prüferin und Vorsitzender der Prüfungskommission übernommen haben. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Cedric Porsiel für das Durchführen und Bereitstellen der SAXS Messungen am iPat bedanken. Einen großen Teil zu dieser Arbeit haben auch die REM und EDX Messungen von Herrn Peter Hinze beigetragen. An dieser Stelle vielen Dank auch für die interessanten und lustigen Gespräche über Vegesack bzw. Bremen Nord und Werder Bremen. Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team der B-IGSM und NanoMet. Die vielen Aktivitäten und Ausflüge haben es ermöglicht einen Blick über den Tellerrand zu erhalten und mein Wissen auch in fachfremden Gebieten zu erweitern. Ohne die Unterstützung meiner Familie und Freunde wäre ich nicht so weit gekommen. Danke an meine Eltern, Dmytro Sumin, Manuela Mumme und Katrin Geese, sowie unsere gesamte Spieleabendgruppe für die Unterstützung in dieser anstrengenden Zeit. Der Dank geht auch an allen anderen Menschen, die zwar nicht genannt wurden, aber trotzdem zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.